

**IN VITRO - UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DAS
HPD - SPEICHERungsverhalten
IM TUMOR UND NORMALGEWEBE
AUF ZELLULÄRER EBENE**

INGO WISTOKAT

1988

Disbui, München

1988



Aus der urologischen Klinik der Universität München

Vorstand: Prof.Dr.med. E. Schmiedt

**IN VITRO - UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DAS
HPD - SPEICHERungsverhalten
IM TUMOR UND NORMALGEWEBE
AUF ZELLULÄRER EBENE**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Ingo Wistokat

aus

Hannover

Jahr

1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Jocham

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. E. Schmiedt
Prof. Dr. med. H. Rabes

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr.rer.nat. H. Schneckenburger

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Mai 1988

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Übersicht	1
2. Einleitung	3
3. Historischer Überblick	11
4. Chemische und physikalische Eigenschaften des HpD	13
4.1 Hämatoporphyrin	13
4.2 Hämatoporphyrin-Derivat	17
4.3 Photofrin II	19
4.4 Absorptions- und Emissionscharakteristika des HpD	22
4.5 Pharmakokinetik des HpD und DHE beim Menschen	25
4.6 Photodynamische Therapie	28
4.6.1 Photobiologische Prozesse	28
4.6.2 Effekte der photodynamischen Therapie auf zellulärer Ebene	32
5. Versuchsplanung	35
5.1 Versuchsziel	35
5.2 In vitro - Untersuchungen	35
5.3 Entscheidungsmerkmale der Zellen	36
5.4 Auswahl der Meßmethode	37
6. Material und Methoden	41
6.1 Die verwendeten Zelllinien	41
6.1.1 Brown-Pearce-Tumorzellen	41
6.1.2 A 549 , NCI - H 358	42

	Seite
6.1.3 OS 24 , M 24	42
6.1.4 ROS 17/2.8 , ROS 25/1	43
6.2 Zellkulturhaltung und Versuchsvorbereitung	44
6.3 Photofrin II	50
6.4 Das Phasenkontrastverfahren	51
6.5 Anregungslichtquelle	56
6.6 Meßanordnung und Meßdurchführung	58
6.7 t-Test für unverbundene Stichproben	62
7. Versuchsdurchführung	68
7.1 Brown - Pearce - Zellen	68
7.1.1 Aufnahme von Photofrin II	68
7.1.2 Photofrin II - Abgabe	
in Abhängigkeit von der Zeit	69
7.2 NCI - H 358 und A 549 - Zellen	70
7.2.1 Photofrin II - Aufnahme	
in Abhängigkeit von der Zeit	70
7.2.2 Photofrin II - Abgabe	
in Abhängigkeit von der Zeit	71
7.3 OS 24 und M 24 - Zellen	71
7.3.1 Pharmakokinetik	71
7.3.2 Einfluß der Zellage zum Zellverband	72
7.4 ROS 17/2.8 und ROS 25/1 Zellen	73
7.5 Intrazelluläre Photofrin II - Verteilung, photographisch dokumentiert	74

	Seite
8. Ergebnisse	75
8.1 Brown - Pearce - Zellen	75
8.1.1 Aufnahme von Photofrin II	75
8.1.1.1 Photofrin II - Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit	75
8.1.1.2 Untersuchungen über das Ausbleichverhalten von Photofrin II - haltigen Zellen während Dauerbeleuchtung	76
8.1.1.3 Halbwertszeiten des Photofrin II - Ausbleichens	80
8.1.1.4 Untersuchung der Ausbleichkurven	82
8.1.2 Abgabe von Photofrin II	83
8.1.2.1 Photofrin II - Abgabe in Abhängigkeit von der Zeit	83
8.1.2.2 Untersuchung der Photofrin II - Komponenten in Abhängigkeit von der Photofrin II - Abgabezeit	86
8.2 NCI - H 358 und A 549 - Zellen	88
8.2.1 Photofrin II - Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit	89
8.2.2 Photofrin II - Abgabe in Abhängigkeit von der Zeit	92
8.2.2.1 NCI - H 358 - Zellen	92
8.2.2.2 A 549 - Zellen	98

8.3	OS 24 und M 24 - Zellen	103
8.3.1	Pharmakokinetik des Photofrin II	103
8.3.2	Einfluß der Zellage zum Zellverband	108
8.4	ROS 17/2.8 und ROS 25/1 Zellen	110
8.5	Intrazelluläre Photofrin II - Verteilung	
	photographisch dokumentiert	117
8.5.1	OS 24 - Zellen	117
8.5.2	M 24 - Zellen	118
8.5.3	ROS 17/2.8 - Zellen	119
8.5.4	ROS 25/1 - Zellen	119
9.	Diskussion	128
9.1	Diskussion der in vitro Untersuchungen	128
9.1.1	Pharmakokinetik des Photofrin II in vitro	128
9.1.2	Diskussion der photographischen	
	Zelldokumentation	131
9.2	Diskussion mit anderen Publikationen	133
10.	Zusammenfassung	143
11.	Literaturverzeichnis	145

ZUSAMMENSTELLUNG HÄUFIG VERWENDETER ABKÜRZUNGEN

ACI	August x Copenhagen Irish
DHE	Dihämatoporphyrinester
FKS	Foetales Kälberserum
GSF	Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH in Neuherberg bei München
Hp	Hämatoporphyrin
HpD	Hämatoporphyrinderivat
KG	Körpergewicht
LDL	Low Density Lipoprotein
NMRI	Naval Medical Research Institut
PDT	Photodynamische Therapie
Ph II	Photofrin II
π	Griechischer Buchstabe "Pi"
TPPS	Tetraphenylporphyrinsulfat

1. ÜBERSICHT

Die vorliegende Arbeit beschreibt in vitro Versuche zur Erfassung von Unterschieden im Hämatoporphyrin (HpD) - Speicherverhalten von malignen Zellen und Normalzellen.

Dazu wurden Fluoreszenzmessungen an jeweils zwei vergleichbaren Zelllinien (Tumorzellen / Normalzellen) von Ratte und Maus durchgeführt, so daß das HpD - Aufnahme- und Ausschleusverhalten dieser Zelllinien in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt werden konnte. Diese Untersuchungen zur Pharmakokinetik von HpD wurden durch Messungen an einzelnen Zellen durchgeführt. Als HpD wurde das im Handel erhältliche Präparat Photofrin II verwendet. Daneben ermöglichte die mikroskopische Beobachtung der Zellen mittels Phasenkontrastverfahren eine qualitative Beschreibung der intrazellulären HpD - Verteilung, die auch photographisch dokumentiert wurde.



2. EINLEITUNG

In den letzten Jahren gewinnt die photodynamische Therapie (PDT) von malignen Tumoren zunehmend an Bedeutung. Bei diesem neuen Therapiekonzept wird eine photosensibilisierende Substanz eingesetzt, die eingestrahlte Lichtenergie absorbiert und zum einen sofort wieder Licht bestimmter Wellenlänge emittiert, zum anderen Energie in eine photochemische Reaktion umsetzt. Die photosensibilisierende Substanz reagiert dabei entweder direkt mit Gewebesubstraten (36), viel häufiger aber überträgt sie ihre Energie auf Sauerstoffmoleküle (91,100). Es entsteht Singulett - Sauerstoff. Durch diese Energieübertragung werden zytotoxische Effekte ausgelöst, die das Gewebe zerstören (100). Gegenwärtig ist Hämatoporphyrin - Derivat (HpD), ein dem Rinderhämoglobin verwandtes Farbstoffgemisch, die am weitesten verbreitete photosensibilisierende Substanz (62). Dieser Photosensibilisator verbindet drei wesentliche Eigenschaften :

- Nach intravenöser Verabreichung akkumuliert er vorzugsweise im tumorösen Gewebe, während das umliegende normale Gewebe einen therapeutisch nutzbaren niedrigeren HpD - Spiegel ausbildet, insbesondere im Zeitraum von 2-8 Tagen nach Applikation von HpD (46, 54, 63).
- In therapeutischen Dosen ist die Substanz per se kaum toxisch oder kanzerogen (35, 52).

- Bei Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge wirkt HpD stark zelltoxisch und fluoresziert.

Die typischen Lichtabsorptionsmaxima des Hämatoporphyrin - Derivates in wässriger Lösung liegen bei (405 ± 40) nm (violett), (540 ± 30) nm (grün) und (630 ± 20) nm (rot). Die stärkste Anregung dieser Substanz gelingt mit violetterem Licht (6, 49).

Auf Grund dieser Charakteristika läßt sich HpD sowohl für therapeutische als auch für diagnostische Zwecke nutzen. HpD-haltiges Gewebe, insbesondere maligne Tumoren einschließlich des Carcinoma in situ (11, 53), können bei Bestrahlung mit violetterem oder grünem Licht anhand der hierdurch induzierten Rotfluoreszenz aufgespürt werden (40, 49, 62, 63). Licht beider Wellenlängenbereiche eignet sich jedoch nicht besonders gut zur therapeutischen Bestrahlung, da es nur gering in das Gewebe penetriert. So wird eine Reduktion der Bestrahlungsintensität auf 37 % bereits in einer Gewebetiefe von 0,1 - 0,2 mm gemessen. In der photodynamischen Therapie wird deshalb das tiefer in das Gewebe eindringende rote Licht (630 ± 20 nm) (Intensitätsabfall auf 37 % erst nach 2 - 3 mm Gewebetiefe) verwendet (97), auch wenn die Lichtabsorption des HpD in diesem Wellenlängenbereich verhältnismäßig schwach ist.

Die unterschiedlichen Eindringtiefen des Lichtes verschiedener Wellenlängen begründen sich im wesentlichen mit dem

Lichtabsorptionsverhalten anderer im Gewebe vorhandener Metalloporphyrine - insbesondere der Hämoglobine, die das rote Licht viel geringer absorbieren als violett oder grünes Licht. Die Lichtabsorption des HpD für rotes Licht ist also in Relation zum Hämoglobin betrachtet sehr günstig.

Seit dem Jahre 1976 sind weltweit mehr als 5000 Krebspatienten mit photodynamischer Therapie behandelt worden (56).

Dabei ist folgende Vorgehensweise typisch :

Nach einer intravenösen Injektion von 2,0 bis 5,0 mg HpD pro kg Körpergewicht (57, 90) verteilt sich die lichtempfindliche Substanz im ganzen Körper und wird anschließend langsam über die Fäzes wieder ausgeschieden (96).

Die unterschiedliche Pharmakokinetik (Akkumulation und Clearance) des HpD in vivo zwischen Normalgewebe und neoplastischem Gewebe hat im Normalgewebe eine geringere HpD - Konzentration als im Tumor zur Folge. Zwei bis fünf Tage nach der HpD - Applikation ist dieser Konzentrationsunterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe so günstig, daß das maligne Gewebe durch geeignete Lichtstrahlung bis zu einer Eindringtiefe von etwa 1 cm selektiv zerstört werden kann. Die Bestrahlung kann in einer Dosierung erfolgen, die bei Zerstörung des Tumors das Normalgewebe nicht schädigt. Eine genaue Lokalisation aller Tumorbereiche ist bei Bestrahlung nicht erforderlich (48, 51). Sehr hohe Lichtdosen können jedoch

auch normales Gewebe zerstören. Die Patienten müssen wegen der parallel vorhandenen Photosensibilisierung von Haut und Schleimhäuten für etwa einen Monat vor direkter Sonnenstrahlung geschützt werden (47).

Setzt sich der Patient dennoch dem hellen Tageslicht aus, sind Verbrennungen der unbedeckten Hautpartien möglich (52,53,83). Um genügend Lichtenergie in Körperhöhlen oder direkt in den Tumor zu leiten, werden flexible Glasfaserlichtleiter eingeführt, durch die Laserlicht transmittiert werden kann. Abgegrenzte Hohlorgane, wie z.B. die Blase, können durch ein Dispersionsmedium gefüllt werden, so daß das eingeleitete Laserlicht ohne visuelle Kontrolle die gesamte Hohlraumwand relativ gleichmäßig bestrahlt (48, 51). Prinzipiell können auch andere Lichtquellen, wie z.B. Quecksilber - Hochdrucklampen oder Xenonlampen, für therapeutische Sitzungen eingesetzt werden. Das Licht dieser Quellen kann jedoch nur unter erheblichen Leistungsverlusten in flexiblen Lichtleitern übertragen werden.

Erfolge mit der photodynamischen Therapie mit partieller oder vollständiger Remission maligner Tumore erzielten bisher Hayata und Kato (1984) im Bereich der Lunge (43), Jocham et al. (52, 55, 57), Benson et al. (12) sowie Ohi et Tsuchiya (76) bei Blasentumoren, Soma et al. (1983) im weiblichen Genitaltrakt (90) Aida et al. (1983) im Ösophagus und im Magen (2, 3) und Dougherty et al. (1981) bei Hautkrebs (31), u.a..

Obwohl die photodynamische Therapie von einer zunehmenden Anzahl von Ärzten zur Behandlung von malignen Tumoren angewendet wird, ist immer noch nicht geklärt, warum der Farbstoff HpD in entarteten Geweben länger als in den meisten gesunden Geweben verbleibt und an welchen zellulären Strukturen der photodynamische Prozeß abläuft. Mehrere in vitro Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen des HpD - Aufnahmeverhaltens gesunder und maligner Zellen haben kontroverse Ergebnisse erbracht.

Chang und Dougherty (22) vergleichen die Normalzellen L 929 und CHO mit den Tumorzellen PC-1 und Hela. Danach gibt es zwischen malignen und normalen Zelllinien keinen Unterschied bei der Aufnahme und Clearance von HpD. Dieses Ergebnis wird durch Zellkulturversuche von Henderson et al. 1983 bestätigt (44). Moan et al. (67) haben vier Arten von Fibroblastzellen von Mäuseembryonen mit unterschiedlichem onkogenen Potential untersucht, indem mittels Fluoreszenzmessungen die HpD - Aufnahmefähigkeit dieser Zellen bestimmt worden ist. Es wird keine zunehmende HpD -Aufnahme oder Photosensibilisierung mit ansteigender Tendenz dieser Zellen, Tumore in syngenetischen immunsuppressierten Mäusen zu induzieren, festgestellt. Berns et al. (14) stellen bei ihren in vitro Messungen von Mäusezelllinien fest, daß die aufgenommene HpD - Menge von Zelllinie zu Zelllinie verschieden ist; sie können aber nicht erkennen, daß entartete Zellen mehr oder weniger HpD als Normalzellen akkumulieren.

Die HpD - Clearance aus malignen Zellen scheint nach bisherigen Untersuchungen dieser Forschungsgruppe jedoch im Vergleich zu Normalzellen verzögert zu sein. Andererseits zeigen Christensen et al. (25), daß transformierte Zellen 25 + 50 % mehr HpD aufnehmen als die entsprechenden normalen Zellen, und Andreoni et al. (5) berichten von verstärkter Zerstörung transformierter Thyroidzellen im Gegensatz zu normalen Schilddrüsenzellen durch HpD - Gabe und anschließende Laserstrahlung mit einem gepulsten N₂ - Laser. Untersuchungen von Gomer und Dougherty (1979) an der Maus demonstrieren eine wesentlich höhere Aufnahme von HpD in Leber, Milz und Nieren als im Tumorgewebe (39). Auch in der Iris der Augen reichert sich die photosensibilisierende Substanz sehr stark an (37). Der selektive Speicherungseffekt ist also kein grundsätzliches Phänomen des Tumorgewebes. Bugelski et al. (20) und Henderson et Dougherty (45) vermuten, daß Veränderungen der vaskulären Permeabilität und der Verlust einer adäquaten Lymphdrainage primär für das unterschiedliche Speicherungsverhalten des Farbstoffes HpD verantwortlich sind. Jocham et Unsöld (54,55) geben zu bedenken, daß Carcinomata in situ wie Tumore mit spezieller Gefäßversorgung durch photodynamische Therapie selektiv zerstört werden, obwohl bei ersteren keine Veränderungen der Gefäßversorgung bzw. der Lymphdrainage zu erwarten sind. Diskutiert werden ferner wesentliche Einflüsse des pH-Wertes, der Temperatur und der Zellgröße auf das unterschiedliche HpD - Speicherungsverhalten.

ten (18). Nach diesen Experimenten besteht also weiterhin Unsicherheit, ob die verlängerte HpD - Retention von Neoplasmen im Verhältnis zu den angrenzenden Normalzellen auf zelluläre Mechanismen zurückzuführen ist.

Ungeklärt ist auch die Frage nach dem Ort der Zellzerstörung. Wenn entartete Zellen in Kultur dem HpD ausgesetzt und anschließend beleuchtet werden, bewirken offenbar Schädigungen der Zellmembran den Zelltod (10, 64). Untersuchungen an Liposomen von Grossweiner (41) deuten auf eine Zellschädigung mittels Lipidoxidation im Rahmen der photodynamischen Therapie hin. Es gibt auch Berichte, die auf andere Zellorganellen als Ziel der Zellschädigung hinweisen. So zeigen Schneckenburger et al. (88), daß Zellbereiche mit hohem HpD - Gehalt auch besonders reich an Mitochondrien sind. Nach Ergebnissen von Berns et al. (13) und Moan et al. (69) binden sich HpD - Moleküle an Mitochondrien. Salet et Moreno (85) zeigen, daß Mitochondrien in Suspension durch photodynamische Therapie mit Hämatoporphyrin angegriffen werden können. Mikrosomen können nach Bickers et al. (17) ebenfalls wie auch Lysosomen, nach Moan et al. (68), mögliche Orte der Schädigung sein.

Schließlich demonstrieren Schneckenburger et al. (88) und Moan et al. (70) eine Abhängigkeit des Ortes der Zellschädigung von der Dauer der HpD - Gabe vor der Lichtbestrahlung. Werden Zellen nur kurz dem Photosensibilisator ausgesetzt, beginnt die Zellzerstörung hauptsächlich an der Zellmembran. Wenn

die Zeit zwischen der Verabreichung von HpD und der Bestrahlung länger wird, werden andere Zellorganellen und die Makromolekülsynthese betroffen (70).

Die vorliegende Arbeit soll mittels in vitro Versuchen klären, ob das unterschiedliche HpD - Speicherungsverhalten von entartetem und normalem Gewebe auch auf zellulärer Ebene nachweisbar ist.

3. HISTORISCHER ÜBERBLICK

Bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts berichtete Raab (82) von der letalen Wirkung des Lichtes auf Paramecien, einzelligen Ciliaten (Wimpertierchen), nach vorausgegangener Exposition mit einem Akridinfarbstoff.

Inspiziert durch diese Beobachtung Raabs wurde von Tappeiner und Jesionek 1903 der erste Versuch unternommen, den photodynamischen Effekt für die Tumorthherapie des Menschen zu nutzen (94). Obwohl sie bei der Behandlung von Hauttumoren mit den photosensibilisierenden Substanzen Eosin oder Fluorescein unter Lichteinwirkung von günstigen Ergebnissen berichteten, erfolgte keine weitere Veröffentlichung.

Erstmals im Jahre 1924 beschrieb Policard in einem mit betahämolyisierenden Bakterien sekundär infizierten Tumor rote Fluoreszenz, die wahrscheinlich auf endogen bakteriell produzierte Porphyrine zurückzuführen war (79).

1942 bemerkten Auler und Banzer (7) diese charakteristische Rotfluoreszenz in Rattentumoren nach intramuskulärer Injektion von Hämatoporphyrin und künstlicher Lichtbestrahlung.

Das auch noch heute verwendete Hämatoporphyrinderivat wurde 1961 von Lipson und Mitarbeitern eingeführt und aus Hämatoporphyrin, einem Abbauprodukt des Rinderhämoglobins, hergestellt (62). Lipson, der Hämatoporphyrinderivat anfangs nur in der Tumordiagnostik anwenden wollte, berichtete 1967 auch über den ersten Gebrauch von HpD in der Krebstherapie.

Neben dem Hämatoporphyrinderivat (62) wurde 1961 von Winkelmann Tetraphenylporphyrin - Sulfonat vorgestellt (101). Obwohl dieses Porphyrin photodynamisch mindestens ebenso wirksam ist wie HpD, wurde es wegen seiner Neurotoxizität klinisch nicht geprüft (34).

Dougherty et al. berichteten 1975, daß systemisch verabreichtes HpD nach Aktivierung mit dem roten Licht einer gefilterten Xenonlampe zu einer vollständigen Zerstörung subkutan implantierter Mammatumore bei Mäusen führte, ohne daß eine wesentliche Schädigung der umliegenden ebenfalls bestrahlten Haut auftrat (30). Seit 1976 und insbesondere seit 1980 wurden weltweit immer mehr Patienten mit der photodynamischen Therapie behandelt.

1984 stellte T.J. Dougherty einen neuen Photosensibilisator mit günstigeren therapeutischen Eigenschaften als das HpD vor (33). Es handelt sich nach seinen Angaben hierbei um die Anreicherung der aktiven Komponenten des HpD, Dihämatoporphyrinnäther und vor allem Dihämatoporphyrinester (DHE).

4. CHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN DES HPD

4.1 HÄMATOPORPHYRIN

Hämatoporphyrin gehört chemisch gesehen zu der Gruppe der Porphinfarbstoffe.

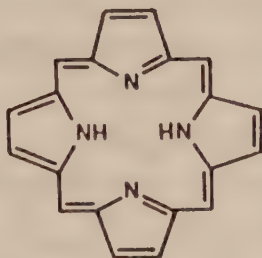


Abb. 01 : Strukturformel des Porphins ($C_{20}H_{14}N_4$)

Porphin ist eine cyclische Verbindung, die aus vier über Methingruppen (=CH-) verbundenen Pyrrolringen besteht. Porphyrine sind Farbstoffe, die durch Substitution von Wasserstoffatomen an den Pyrrolringen des Porphins entstehen. Die Porphyrine zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, mit Metallionen Komplexe zu bilden. Diese Metalloporphyrine stellen die prosthetische Gruppe vieler im Stoffwechsel der Zelle wichtiger Proteine dar wie das magnesiumhaltige Chlorophyll (grüner Blattfarbstoff), das rubinrote, kobalthaltige

Cobalamin (Vitamin B 12), weiter auch die mitochondrialen und mikrosomalen Cytochrome, Katalasen, Peroxidasen usw. , sowie die Hämoglobine. Bei Hämatoporphyrin handelt es sich um ein metallfreies Abbauprodukt des Rinderhämoglobins.

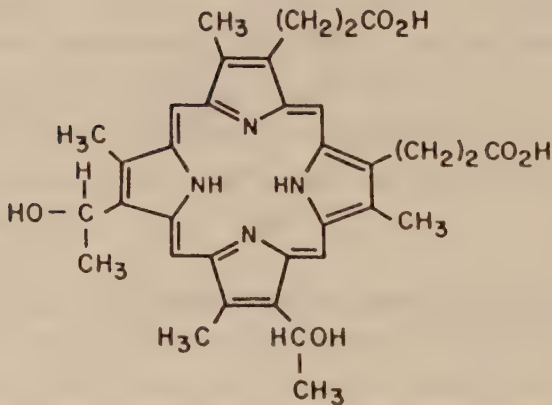


Abb. 02 : Strukturformel des Hämatoporphyrin ($C_{34}H_{38}O_6N_4$)

Charakteristisch für die Porphyrine ist ihr Verhalten als Naturfarbstoffe durch die Ausbildung konjugierter Doppelbindungen des Porphingerüsts. Nach der Vorstellung des Orbital-Modelles erfordert ein durchgehendes System konjugierter Dop-

pelbindungen (d.h. fortwährendes Alternieren von Doppelbindung und Einfachbindung) wie im Porphin, daß jedes beteiligte Kohlenstoffatom (bzw. Stickstoffatom) mindestens ein mit einem Elektron besetztes p - Orbital besitzt. Diese p - Orbitale können, sofern sie benachbart liegen, - wie auch bei konjugierten Doppelbindungen - eine π -Bindung ausbilden. Da nun beide benachbarten Kohlenstoff- bzw. Stickstoffatome p -Orbitale besitzen, ist die Ausrichtung der π -Bindung zum einen oder anderen Nachbaratom einem ständigen Wechsel unterworfen . Die π - Elektronen , die die π - Bindungen ausmachen, befinden sich also bei konjugierten Doppelbindungen nicht streng zwischen den doppelt miteinander verbundenen C - Atomen bzw. N - Atomen, sondern verteilen sich mehr oder weniger gleichmäßig über das gesamte π - Bindungssystem, sofern dieses Bindungssystem eben ist. Man spricht von Delokalisation.

Die dargestellten Strukturformeln des Porphins (*Abb.01*) und des Hämatoporphyrins (*Abb.02*) entsprechen demnach auch nicht ihren wahren Strukturen, sondern jeweils nur einer möglichen sogenannten Grenzstruktur. Diese Erscheinung, daß die in einem organischen Molekül vorliegenden Bindungsverhältnisse nicht durch eine einzige Strukturformel dargestellt werden können, weil sie sich aus der Überlagerung mehrerer durch die Elektronenanordnung unterschiedlicher Grenzzustände ergeben, bezeichnet man als Mesomerie.

Ist eine optimale Delokalisation der π - Elektronen erreicht, so befindet sich das mesomere Bindungssystem im energieärmsten und relativ stabilsten Zustand. Wird diesem System Lichtenergie geeigneter Wellenlänge zugeführt, nimmt die Delokalisation ab, und das Bindungssystem nähert sich einem seiner Grenzzustände mit höherem Energieniveau als bei optimaler Delokalisation. Wird ein labiler, hochenergetischer Grenzzustand erreicht, so kommt es innerhalb von typischerweise 10^{-9} Sekunden zur Energieabgabe und erneuten Delokalisierung der π - Elektronen.

Mehrere Formen dieser Energieabgabe sind möglich:

Entweder als Lichtemission - Fluoreszenz genannt - oder durch strahlenlose Prozesse als Wärme oder in Form einer photochemischen Reaktion. Das Molekül reagiert in der photochemischen Reaktion entweder direkt mit einem benachbarten Molekül, oder es gibt seine Energie an ein Sauerstoffmolekül ab. Im letzten Fall entsteht Singulett - Sauerstoff (36, 91).

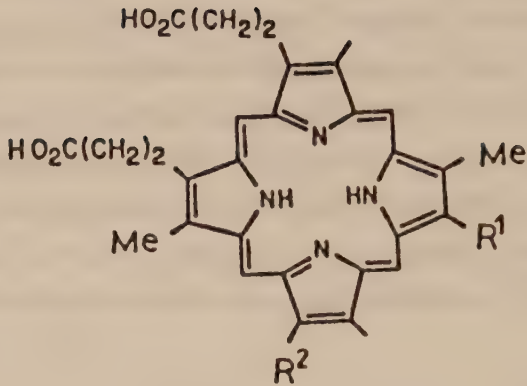
Im Absorptions- und Emissionsverhalten sind sich die Porphyrine ähnlich. Sie zeigen sowohl im sichtbaren als auch im ultravioletten Bereich des Lichtspektrums ein spezifisches Absorptionsverhalten. Besonders charakteristisch ist die nach ihrem Entdecker benannte Soret - Bande, eine auffallend hohe Lichtabsorption bei etwa 400 nm Wellenlänge.

Löst man Porphyrine in organischen Lösungsmitteln oder in anorganischen Säuren und bestrahlt sie mit ultraviolettem

Licht, dann zeigen sie eine rote Fluoreszenz. Diese Rotfluoreszenz ist so typisch für Porphyrine, daß sie als Nachweisreaktion auch kleinerer Porphyrinmengen benutzt wird (z.B. Nachweis einer Porphyrinurie bei Porphyrien). Die Rotfluoreszenz ist demnach nicht charakteristisch für Hämatorporphyrin sondern für alle Porphyrine. Durch die unterschiedlichen Wasserstoffatoms substituenten am Porphingerüst ergeben sich jedoch spezifische Fluoreszenzspektren für die einzelnen Porphyrine, die spektrophotometrisch erfaßt werden können.

4.2 HÄMATOPORPHYRIN-DERIVAT

Hämatorporphyrinderivat (HpD) wird aus Hämatorporphyrin (Hp) hergestellt. Das Verfahren zur Produktion von HpD wurde von Lipson (62) entwickelt, anläßlich des Versuchs, eine Reinsubstanz herzustellen, die besser vom Tumor aufgenommen wird. Dieses Verfahren mit Veresterung von Hp mit einem Eisessig - Schwefelsäuregemisch führt zu einem Porphyringemisch von mindestens 10 Einzelkomponenten in wechselnder Zusammensetzung, dem HpD (19) (Abb. 03).



1. $R^1 = R^2 = \text{CH(OH)Me}$
2. $R^1 = \text{CH(OH)Me}$ $R^2 = \text{CH(OAc)Me}$
3. $R^1 = \text{CH(OAc)Me}$ $R^2 = \text{CH(OH)Me}$
4. $R^1 = \text{CH-CH}_3$ $R^2 = \text{CH(OH)Me}$
5. $R^1 = \text{CH(OH)Me}$ $R^2 = \text{CH-CH}_3$
6. $R^1 = R^2 = \text{CH(OAc)Me}$
7. $R^1 = \text{CH-CH}_3$ $R^2 = \text{CH(OAc)Me}$
8. $R^1 = \text{CH(OAc)Me}$ $R^2 = \text{CH-CH}_3$
9. $R^1 = R^2 = \text{CH-CH}_3$
10. $R^1 = R^2 = \text{CO(CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$

Abb. 03 : Strukturformel des Hämato-porphyrinderivats (HpD)
mit seinen bekannten Seitenkettensubstituenten

4.3 PHOTOFRIN II

Hämatoporphyrinderivat wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht, und die Möglichkeit, mit HpD Tumore zu lokalisieren und zu photosensibilisieren, wurde für die klinische Anwendung erkannt (29). Jedoch erwies es sich als schwierig, dieses Porphyringemisch pharmakokinetisch zu untersuchen und chemisch zu charakterisieren. Nicht alle Komponenten des Hämatoporphyrinderivates sind gleich gute Photosensibilisatoren für Tumore.

Die ideale photosensibilisierende Substanz für die photodynamische Therapie maligner Tumore sollte folgende Eigenschaften erfüllen :

1. Sie sollte nur von malignen Geweben aufgenommen und gespeichert werden.
2. Die Substanz sollte Licht in Wellenlängenbereichen absorbieren, die die Zerstörung malignen Gewebes in Gang setzen können. Dieses Licht sollte möglichst tief in das Gewebe penetrieren können, also vom Gewebe nicht absorbiert werden.
3. Die photosensibilisierende Substanz sollte keine systemtoxische Wirkung besitzen.

Die aktivste Komponente des HpD, die Komponente die die oben genannten Eigenschaften am besten erfüllt, ist ein Dihämatoporphyrin - Ester (DHE), der 1984 von Dougherty eingeführt

wurde (33). Der Handelsname ist Photofrin II.

Photofrin II wird mittels chromatografischer Methoden aus HpD hergestellt . Chromatografische Analysen zeigen , daß Hämatoporphyrinderivat und Photofrin II die gleichen Hauptkomponenten enthalten, jedoch in unterschiedlichen Verhältnissen. Photofrin II besteht hauptsächlich aus der am wenigsten polaren Komponente des HpD, nämlich dem DHE. Diese Komponente wird vorzugsweise von den Zellen aufgenommen (74). Zusätzlich scheint der DHE in Tierversuchen ein günstigeres therapeutisches Verhältnis (Aufnahmeverhältnis Tumor zur äußeren Haut) zu haben als das HpD - Gemisch.

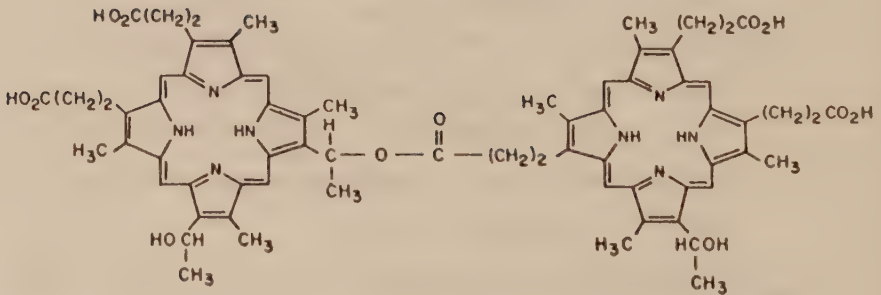


Abb. 04 : Strukturformel des Dihämatoporphyrin - Esters (DHE)

Dihämatoporphyrin - Ester besitzt eine starke Tendenz, in wässerigen Lösungen zu aggregieren. Auch in der Gegenwart von Albumin, in einer Konzentration ähnlich wie sie im Serum gefunden wird (etwa 30 mg/ml), besteht diese Tendenz. Dougherty hält diese starke Tendenz zur Selbstaggregation verantwortlich für das verlängerte Zurückhalten von HpD und DHE im Tumor (34).

In wässerigen Lösungen zeigt DHE kaum Fluoreszenz. In Tetrahydrofuran, einem Mittel, das die DHE - Aggregate löst, läßt sich starke Fluoreszenz nach Applikation von DHE auch in tierischen und menschlichen Tumoren ähnlich wie bei HpD nachweisen (34).

Aggregiertes DHE produziert unter Beleuchtung kaum Singulett-Sauerstoff. Es ist deshalb anzunehmen, daß Dihämatoporphyrin-Ester und -Äther - Aggregate wichtig sind für die Aufnahme und Retention im Tumor, während sie für die Fluoreszenz und den photosensibilisierenden Effekt nicht verantwortlich sind. Diese DHE - Verbindungen müssen also erst gelöst werden, um in der photodynamischen Therapie zu wirken . Nach Untersuchungen von Dougherty an DBA/2 Ha Mäusen ist nur die halbe Menge DHE im Vergleich zu HpD notwendig, um nach Injektion einen ähnlich wirksamen Gewebespiegel zu erreichen (34). Der Dihämatoporphyrin - Ester stellt somit wahrscheinlich eine brauchbarere photosensibilisierende Substanz dar als das Hämatoporphyrinderivat .

4.4 ABSORPTIONS- UND EMISSIONSCHARAKTERISTIKA DES HPD

Für HpD und für HpD im Gewebe sind reproduzierbare typische Extinktions- und Emissionskurven erhältlich.

Die folgende Abbildung zeigt die Absorptionsmaxima von in einem Brown - Pearce - Carcinom gespeicherten HpD für Licht von unterschiedlicher Wellenlänge (49) :

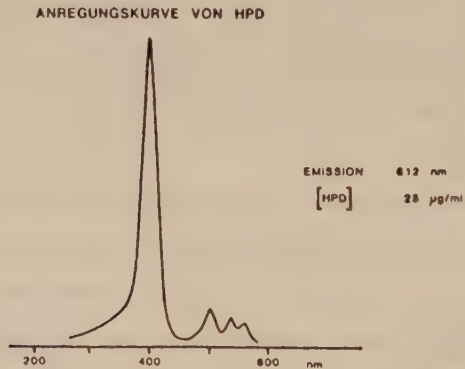


Abb. 05 : Absorptionsmaxima des im Gewebe gespeicherten HpD für sichtbares Licht

Deutlich ist erkennbar, daß die maximale Lichtabsorption des HpD bei einer Wellenlänge von 405 nm, also im violetten Bereich, liegt. Demgegenüber wird das therapeutisch verwendete, gut gewebe penetrierende rote Licht deutlich geringer absorbiert.

Das HpD - Emissionsspektrum ist in der folgenden Abbildung dargestellt (49) :

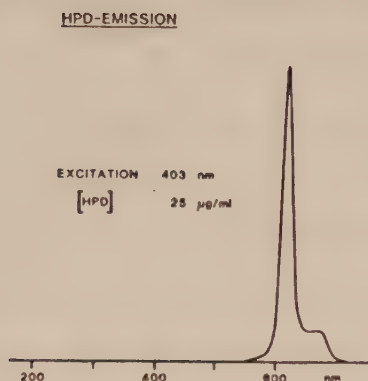


Abb. 06 : Emissionskurve des HpD im Gewebe; das HpD wurde mit einer Wellenlänge von 403 nm zur Fluoreszenz angeregt.

Bei Anregung mit violetterem Licht von 403 nm Wellenlänge zeigt sich die für Porphyrine typische Rotfluoreszenz mit einer maximalen Emission um 630 nm. Bei Verwendung anderer Anregungswellenlängen ergeben sich leichte Veränderungen der Fluoreszenzausbeute bei prinzipiell gleichbleibender Kurvencharakteristik (6).

Sowohl die Absorptions- als auch die Emissionsmaxima des HpD weisen je nach verwendeter HpD - Charge, Alter der Charge und äußerem Milieu geringfügige Abweichungen auf. Dennoch besitzen die Hämatoporphyrin - Derivate einschließlich des Dihämatoporphyrin - Esters (DHE) ähnliche Extinktions- und Emissionscharakteristika, so daß die beiden dargestellten Kurven als repräsentativ gelten können (6, 92).

4.5 PHARMAKOKINETIK DES HPD UND DHE BEIM MENSCHEN

Nach intravenöser Injektion von 2,5 mg HpD pro kg Körpergewicht bildet sich beim Menschen innerhalb kurzer Zeit ein Blutspiegel von etwa 20 µg/ml aus. Bei einer HpD-Dosis von 5 mg pro kg Körpergewicht lassen sich initial Blutspiegel von 35 ÷ 40 µg/ml nachweisen (50). Beim Menschen ist die Halbwertszeit des HpD und DHE im Serum biphasisch. Anfänglich beträgt sie 9 ÷ 14 Stunden und wird gefolgt von einer längeren Serum-Halbwertszeit von 25 ÷ 35 Stunden (35). Nach 5 Tagen ist das HpD bzw. DHE im Serum nicht mehr nachweisbar. Intravenös wie auch intraperitoneal appliziertes Hämatoporphyrinderivat verteilt sich bei der Ratte innerhalb der ersten 3 Stunden (bei intraperitonealer Applikation später) in allen Geweben mit Ausnahme des zentralen Nervensystems gleichmäßig im Parenchym und Stroma der Organe. Nach Abnahme der Serumkonzentration des HpD wird ein organspezifisches Speicherungsverhalten deutlich (50). So ist über mehrere Tage hinweg bei Makrophagen und Zellen des reticulo-endothelialen Systems nur eine geringe HpD - Clearance vorhanden. In Organen wie Leber, Niere und Milz wird HpD sogar mehr gespeichert als in vielen Tumoren (80).

Je nach Tierart ist die Ausscheidung des Hämatoporphyrinderivats verschieden : So scheiden z.B. Kaninchen bis zu ca. 40 % der verabreichten Substanz über den Urin aus. Bei Ratten hingegen ist die Ausscheidung über den Urin minimal.

HpD wird bei Ratten wie auch beim Menschen hauptsächlich über die Fäzes ausgeschieden (96).

Wichtig für die HpD - Ausscheidung über die Gallenwege ist jedoch ein intakter Leberstoffwechsel, denn die Hauptmenge des HpD wird in der Leber metabolisiert und dann über die Gallenwege ausgeschieden (50).

Bei Untersuchungen zur Toxizität von HpD und DHE wurde bei Mäusen nach intraperitonealer Injektion und Tierhaltung in der Dunkelheit wurde eine LD₅₀- Dosis 24 Stunden nach Applikation von 275 mg HpD pro kg Körpergewicht ermittelt. Über einen Zeitraum von 14 Tagen betrachtet, sinkt die LD₅₀- Dosis bei männlichen Tieren auf 230 mg pro kg Körpergewicht und bei weiblichen Mäusen auf 180 mg pro kg Körpergewicht. Eine Gabe von 50 mg HpD pro kg Körpergewicht, an jeweils 5 aufeinander folgenden Tagen verabreicht, führt bei Mäusen nicht zum Tod (35).

Alle diese Werte beziehen sich auf Hämatoporphyrinderivat. Dihämatoporphyrinester ist auf Gewichtsbasis betrachtet etwa doppelt so toxisch wie HpD. Um den gleichen therapeutischen Effekt zu erzielen wie mit HpD, ist bei DHE jedoch nur etwa die halbe Dosis notwendig. Bei den Mäusen trat der Tod infolge von Leber- und Nierennekrosen ein. Das Knochenmark wurde nicht betroffen (35).

Beide Porphyrine sind toxischer, wenn die Tiere dem Licht ausgesetzt sind. So wurde die LD₅₀- Dosis (bei rasierten

Mäusen gemessen) durch eine fünfstündige Exposition mit Licht in therapeutischer Dosierung von $50 \div 120 \text{ J/cm}^2$ auf 7,5 mg HpD pro kg Körpergewicht in 24 Stunden gesenkt. Die entsprechende DHE-Dosis beträgt etwa 4 mg pro kg Körpergewicht. Diese Tiere starben unter Schock - Symptomatik (35).

Beim Menschen wurden unter klinischen Anwendungen mit Dosen bis zu 3 mg Photofrin II pro kg Körpergewicht (KG) keine schweren Nebenwirkungen beobachtet. Bei Patienten, denen 3,0 mg Photofrin II (DHE) pro kg KG verabreicht wurde, war die Haut ähnlich lichtempfindlich wie bei anderen Patienten, die 3,0 mg HpD pro kg KG appliziert erhielten. Die therapeutische Wirkung des DHE liegt jedoch etwa um den Faktor zwei höher als die des HpD (32). Bei gleicher therapeutischer Wirksamkeit zeigt Photofrin II weniger dermatogene Nebenwirkungen.

4.6 PHOTODYNAMISCHE THERAPIE

4.6.1 PHOTOBIOLOGISCHE PROZESSE

Für photochemische Reaktionen ist die Anregung von Elektronen eine Voraussetzung. Man bezeichnet den niedrigsten Energiezustand des Atoms als Grundzustand. Anregungen in die ersten, zweiten und die folgenden energiereicheren Orbitale führen zur Ausbildung des ersten, zweiten und höher angeregten Zustandes. Ganz wesentlich ist dabei die relative Einstellung der Elektronenspins im Grundzustand und den angeregten Zuständen. Im Grundzustand werden alle Elektronen, die gepaart ein Orbital besetzen, durch ihren Spin unterschieden. Jeder $+1/2$ Spin wird von einem $-1/2$ Spin ausgeglichen, d.h. sonst gleiche Elektronen werden wenigstens durch ihren Spin unterschieden.

Der Schweizer Physiker und Nobelpreisträger Pauli formulierte dieses 1925 durch folgende grundlegende Aussage : In einem Atom können keine zwei Elektronen in Bezug auf ihren Zustand völlig übereinstimmen (Pauli - Prinzip).

In zwei- und mehratomigen Molekülen liegt eine vergleichbare Situation vor. Üblicherweise ist jedes Molekülorbital mit zwei Elektronen gefüllt, die sich im Grundzustand durch ihre relative Spineinstellung unterscheiden. Wird ein Elektron durch Anregung (Absorption von Licht) in ein nicht besetztes Molekülorbital überführt, entsteht ein angeregter Zustand. Das angeregte Elektron kann seinen Spin beibehalten oder die

Richtung des Spins ändern. Wenn der Spin beibehalten wird, d.h. der Spin bleibt antiparallel zum Spin des zweiten Elektrons im ursprünglich gemeinsamen Orbital, dann handelt es sich um einen angeregten Singulett - Zustand (Multiplizität $M = 1$). Ändert sich der Spin, d.h. der Spin nimmt eine parallele Lage zum Spin des zweiten Elektrons im ursprünglich gemeinsamen Orbital an, ergibt sich ein Triplett - Zustand (Multiplizität $M = 3$). Die niedrigsten Singulett- und Triplett - Zustände unterscheiden sich recht deutlich :

- Der niedrigste angeregte Singulett - Zustand besitzt meistens eine höhere absolute Energie als der niedrigste Triplett - Zustand.
- Die Lebensdauer vor der Lichtemission ist beim Triplett-Zustand ungefähr 1 Million mal länger als beim Singulett-Zustand.

Entstehen durch Lichtabsorption höher angeregte Zustände, so werden diese durch strahlungslose Übergänge in die niedrigsten angeregten Zustände überführt (91).

Aus dem niedrigsten angeregten Singulett - Zustand S_1 sind folgende Veränderungen möglich :

- Übergang von S_1 zum Grundzustand S_0 unter Abgabe von Fluoreszenz für ca. 10 ns.
- Strahlungsloser Übergang von S_1 zum angeregten Triplett-Zustand T_1 .
- Eintreten einer photochemischen Reaktion.

Aus dem erheblich länger dauernden niedrigsten Triplett - Zustand T_1 kann sich folgendes entwickeln :

- Übergang von T_1 zu S_0 unter Emission von Phosphoreszenz für 100 ms oder länger (vergleiche Dauer der Fluoreszenz).
- Eintreten einer photochemischen Reaktion.

Da der Triplett - Zustand wesentlich länger besteht als der Singulett - Zustand, bevor die Lumineszenz eintritt, finden viele photochemische Reaktionen aus diesem Zustand statt.

Bei Molekülen mit vielfach gebundenen Atomen können jedoch auch noch andere Anregungsvorgänge neben den reinen Elektronenanregungen stattfinden. Hierzu gehören die Schwingungen und Rotationsvorgänge des Moleküls. Dabei bewegt sich das Molekül als Ganzes jedoch nicht, vielmehr rotiert das Molekül um sein Massenzentrum, jene Position im Raum, in der man sich die Molekülmasse punktförmig konzentriert vorstellen kann.

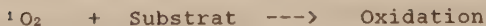
Zusätzlich zur Rotationsbewegung kann ein Molekül auch schwingen, d.h. die Abstände der miteinander verbundenen Atome des Moleküls ändern sich. Diese Schwingungen sind oszillierender oder periodischer Natur. Die Energieniveaus bei diesen Schwingungs- und Rotationsbewegungen sind gequantelt. Je nach Wellenlängenbereich des für die Anregung verwendeten Lichtes ergeben sich die verschiedenen Anregungsvorgänge :

- Rotation bei Anregung im Mikrowellenbereich (100 μm und länger)
- Schwingungen bei Absorption im mittleren und fernen Infrarotbereich (2 bis 100 μm)
- Elektronenanregung bei Bestrahlung im Bereich des ultravioletten, sichtbaren und nahen Infrarotbereiches (100 nm bis 1200 nm).

Bei der photodynamischen Therapie wird im Bereich des sichtbaren Lichtes angeregt, so daß die Elektronenanregung dabei der wesentliche Vorgang ist.

Bestrahlter Dihämatoporphyrin - Ester wird aus dem Grundzustand in den angeregten Singulett - Zustand versetzt. Dieser angeregte DHE verändert sich innerhalb von einigen Nanosekunden, indem er rot fluoresziert und damit wieder seinen Grundzustand erreicht oder es findet ein Übergang in den längerlebigen angeregten Triplett - Zustand (Halbwertszeit im Bereich von einigen hundert Mikrosekunden) statt (91). Dihämatoporphyrin - Ester kann im angeregten Triplett - Zustand mit einem Sauerstoffmolekül im Grundzustand, der ein Triplett - Zustand ist, reagieren, so daß der chemisch reaktive Singulett - Sauerstoff entsteht.

Durch Singulett - Sauerstoff können viele zelluläre Bestandteile (Substrate) einschließlich Proteine, Nukleinsäuren und Phospholipide (1) angegriffen werden.



DHE im angeregten Triplett - Zustand kann, wenn auch seltener über einen Elektronentransfer, mit Sauerstoff reagieren. Es entsteht dann ein freies Radikal, das aggressive Superoxid O_2^- (91). Ferner gibt es noch die Möglichkeit, daß der im angeregten Triplett-Zustand befindliche DHE direkt mit bestimmten Substraten reagiert und damit die Bildung freier Radikale induziert (36).

4.6.2 EFFEKTE DER PHOTODYNAMISCHEN THERAPIE AUF ZELLULÄRER EBENE

Die Membranstrukturen der Zelle sind die Organellen, die mit am empfindlichsten auf die photodynamische Therapie reagieren. Erstes morphologisches Zeichen einer photodynamisch therapeutisch bedingten Zellschädigung ist eine Schwellung der Zellmembran mit Blasenbildung. Dabei nimmt die Hydrophobizität der Zellmembran ab (10, 66).

Nach Moan und Christensen erhöht eine fraktionierte Bestrahlung den Therapieeffekt gegenüber einer einmaligen Bestrahlung gleicher Gesamtdosis. Verantwortlich für diesen Effekt ist wahrscheinlich eine Störung der Membranpermeabilität bei der Erstbestrahlung mit nachfolgender vermehrter Aufnahme, der photosensibilisierenden Substanz (65).

Untersuchungen an Liposomen weisen auf eine Beteiligung von Lipidoxidation an der Zellzerstörung hin (41). Weitere Angriffspunkte stellen die Enzyme der Mitochondrien (13,85,88) und die Mikrosomen dar (17). Ebenso beschrieben werden eine Störung des Nukleosid- und Aminosäuretransportes im Zellinnern und eine gesteigerte Permeabilität und das Zerplatzen von Lysosomen (68). Moan und Christensen haben untersucht, ob der photodynamische Therapieeffekt abhängig vom Zellzyklus ist (66). Während der mitotischen Zellteilung werden die Zellen durch die photodynamische Therapie in der Metaphase blockiert. Eine Inaktivierung der Polymerasen der Proteine, die zur Spindelbildung während der Metaphase notwendig sind, ist deshalb anzunehmen (66). Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, sind gegenüber der PDT am empfindlichsten. Da die Kernmembran in dieser Zyklusphase am instabilsten im Vergleich zu anderen Zyklusphasen ist, kann auch dieser zyklusabhängige Effekt durch die zerstörerischen Einflüsse der PDT auf die Membranen der Zelle ausgelöst sein.

Moan et al. und Schneckenburger et al. beschreiben eine Abhängigkeit des Ortes der Zellschädigung von der Dauer der HpD - Gabe vor der Lichtbestrahlung. Werden Zellen dem Photosensibilisator nur kurz ausgesetzt, beginnt die Zellzerstörung hauptsächlich an der Zellmembran. Wird die Zeitspanne zwischen der Verabreichung von HpD und der Bestrahlung länger, werden andere Zellorganellen und die Makromolekülsynthese betroffen (70, 88).

Im allgemeinen werden jeweils die Proteine der verschiedenen Zellorganellen als vorwiegender molekularer Angriffspunkt angesehen.

5. VERSUCHSPLANUNG

5.1 VERSUCHSZIEL

Das grundsätzliche Ziel der gesamten Arbeit ist es, festzustellen, ob sich das bekannte unterschiedliche HpD - Speicherverhalten im Tumor und Normalgewebe auch auf zellulärer Ebene nachweisen läßt.

Die zum Teil kontroversen Resultate verschiedener Arbeitsgruppen sind bereits im Kapitel 2 aufgeführt.

Nach diesen Ergebnissen (5,14,22,25,44,55,67) besteht also weiterhin Unsicherheit, ob die in vivo beobachtete verlängerte HpD - Retention von Neoplasmen im Verhältnis zu den angrenzenden Normalzellen auf zelluläre Mechanismen zurückzuführen ist. So erscheint es sinnvoll, weitere qualifizierte Zellkulturversuche durchzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit werden Einzelzellen aus ausgewählten Zellkulturen in vitro mittels zeitabhängiger Fluoreszenzmessungen direkt in der Petrischale vermessen, in der die Zellen herangewachsen sind. Folgende Kriterien beeinflussen diesen Versuchsansatz:

5.2 IN VITRO - UNTERSUCHUNGEN

Der Nachweis einer unterschiedlichen HpD - Speicherung von Zellen aufgrund zellspezifischer Eigenschaften erfordert eine möglichst isolierte Betrachtung einzelner Zellen bei fest definiertem äußeren Milieu.

Die Einflußnahme zellexterner Parameter, wie z.B. Blutversorgung, Lymphdrainage, pH - Wert und Anwesenheit anderer Zellarten (Makrophagen u.a.), die auch für die tumorselektive längere HpD - Speicherung verantwortlich gemacht werden (18, 20, 45, 75, 98), wird durch in vitro - Untersuchungen ausgeschaltet bzw. kontrollierbar. Würden sich für beide Zelllinien (Tumorzellen / Normalzellen) bei gleichem, fest definiertem äußeren Milieu HpD-Speicherungsunterschiede ergeben, müßten diese auf zellgebundene Mechanismen zurückgeführt werden.

5.3 ENTSCHEIDUNGSMERKMALE DER ZELLEN

Zur Durchführung aussagekräftiger Versuche müssen die verwendeten Zelllinien wichtige Eigenschaften aufweisen. Ideal wäre ein Zellpaar (Tumorzelllinie / Normalzelllinie), bei dem die Tumorzelle direkt aus der Normalzelle induziert wurde und bei dem die Züchtungseigenschaften günstig und Messungen möglich sind. Wesentlich für die Zellzüchtung ist eine ausreichende Unempfindlichkeit und ein gleichmäßiges, aber nicht zu schnelles Wachstum. Dieses läßt sich regulieren durch Änderung der Konzentration von foetalem Kälberserum im Zellmedium. So erreicht man, daß das Zellwachstum über die gesamte Meßperiode von bis zu fünf Tagen kontinuierlich erfolgt. Für den Meßvorgang selbst müssen die Zellen gut abgrenzbar sein und es müssen isolierte bzw. in einem Zellteppich rand-

ständige Zellen durch Ausblenden der Fluoreszenz von Nachbarzellen einzeln meßbar sein. Die Zellgröße der Tumorzellen sollte die der Normalzellen möglichst nicht, zumindest nicht wesentlich überschreiten. Leider ließ sich diese Idealvorstellung im Rahmen der eigenen Versuche nicht verwirklichen. Das Zellpaar ROS 17/28 mit ROS 25/1 (siehe unten) entspricht diesen Wünschen von allen etwa 20 überprüften Zelllinien am besten. Auch die Kombination OS 24 und M 24 ist günstig.

5.4 AUSWAHL DER MEßMETHODE

Im wesentlichen bieten sich zwei Meßmethoden zum quantitativen Nachweis des HpD in Zellen an. Die eine Nachweismethode basiert auf einer radioaktiven Markierung der HpD - Moleküle, die üblicherweise unter Verwendung eines radioaktiven Isotopes ^{14}C oder ^3H geschieht (20). Mit dem Isotopennachweis kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die vermessenen Isotope nicht mittlerweile verstoffwechselt worden sind und damit biologisch unwirksame Stoffwechselprodukte gemeinsam mit dem photodynamisch aktiven HpD gemessen werden. Winkelmann et al. (101) beschrieben im Jahr 1967 erhebliche Unterschiede bei Konzentrationsmessungen in vivo zwischen ^3H - und ^{14}C - markierten Tetraphenylporphyrinsulfat (TPPS), die sich insbesondere über einen erheblichen intermolekularen Protonenaustausch erklären lassen.

Die andere Methode des HpD - Nachweises benutzt die photochemischen Eigenschaften der Porphyrine. Mit Hilfe von auf bestimmte Wellenlängen begrenzten Fluoreszenzmessungen läßt sich das HpD in den Zellen quantitativ messen. Die für die HpD - Bestimmung günstige Rotfluoreszenz ist charakteristisch für alle Porphyrine und ermöglicht somit keine Unterscheidung zwischen organischen Gewebestoffen wie Hämoglobin, Myoglobin, Cytochromen und HpD. Mittels der Fluoreszenzphotometrie gelingt es, zumindest weitestgehend, speziell die Porphyrine zu erfassen, die im HpD enthalten sind, sowie die Fluoreszenz störender Porphyrine auszublenden und zu subtrahieren. Gemessen wird also die Fluoreszenzkomponente des DHE, die strenggenommen keine direkte Messung der therapeutischen Wirksamkeit darstellt (vergleiche 4.3) (34). Es wird einerseits der Dihämatoporphyrinester als auch der durch nucleophile Substitution aus Dihämatoporphyrinester (Gleichgewichtsreaktion) entstehende ebenfalls wirksame Dihämatoporphyrinäther erfaßt (59, 87).

Bei den eigenen Arbeiten wurde ausschließlich nach der fluoreszenzphotometrischen Methode verfahren, da die Störfaktoren hier besser zu beherrschen sind. Zuzüglich zu der Fluoreszenzmessung eines nur engen, für die HpD - Bestimmung geeigneten Spektralbereiches wurden in jeder Meßreihe Fluoreszenzmessungen an nicht mit HpD versetzten, ansonsten völlig gleich behandelten Zellen durchgeführt. Der so er-

mittelte Meßwert wurde dann als Eigenfluoreszenz unter Mit-
erfassung des Streulichts von den anderen Meßwerten abgezogen, um so die störende Fluoreszenz nicht HpD zugehöriger anderer Porphyrine in der Auswertung gering zu halten.

Alle Meßserien erfolgten an Einzelzellen, d.h. es wurde die Fluoreszenz jeweils einer isolierten Zelle (Ausblenden der umliegenden Zellen) gemessen, die in Bezug auf Größe und intrazelluläre Strukturen möglichst mit anderen Zellen vergleichbar war. Dieses Verfahren vereinfachte es, standardisierte Versuchsbedingungen einzuhalten. Bei Messungen eines Zellrasenteils mit konstantem Meßfenster hingegen würde die Zellzahl pro Meßfenster mit der Dauer einer Versuchsserie zunehmen, und es würde vielleicht sogar teilweise gar keine einschichtige Zelllage (Monolayer) vermessen werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt beim Versuchsaufbau bestand darin, die Messung der Zellen in der Petrischale vorzunehmen, in der sie angezüchtet wurden. Hiermit ließ sich die weniger zellschonende Aufbereitung einer Zellsuspension mittels Trypsin vermeiden, bei der die Zellen auf einen Objektträger aufzubringen sind, was erfahrungsgemäß zu optischen Zellveränderungen (Zellen sind nicht mehr am Boden angewachsen) führt. Die meisten Zellen wurden bei der eigenen Versuchsanordnung somit bis zum Meßbeginn in ihrer Vitalität kaum gestört und stellten sich mikroskopisch betrachtet im Nährmedium direkt aus dem Brutschrank kommend völlig gleich dar wie

später unter dem Meßmikroskop vor der Messung.

Die Zellen wurden immer abwechselnd mit dem Phasenkontrastverfahren selektiert, weil dieses Verfahren neben einer schärferen äußeren Abgrenzung der Zellen auch durch die gute intrazelluläre Auflösung ein sicheres Auffinden morphologisch vergleichbarer Zellen ermöglicht, und dann fluometrisch vermessen.

Da jede Zelle einzeln unter einem Phasenkontrastmikroskop selektiert wurde, konnten dabei gezielt vitale Zellen mit nachstehenden Eigenschaften ausgesucht werden:

Das Cytoplasma der Zellen war scharf nach außen hin abgegrenzt aber nicht abgerundet. Zellen mit mäßig ausgeprägten Fortsätzen und Pseudopodien wurden bevorzugt ausgewählt, sofern dieses für die Zelllinie, z.B. ROS 25/1 üblich war.

Als weiteres wichtiges Auswahlkriterium wurde der Zellkern betrachtet. Die vermessenen Zellen sollten sich in der Interphase des Wachstumszyklus befinden. Der Nukleus der ausgewählten Zellen mußte deshalb scharf abgegrenzt werden können und mindestens ein Nucleolus mußte vorhanden sein. Zellen, die sich nach diesen Kriterien wahrscheinlich oder sicher in einer Mitosephase befanden oder möglicherweise avital sein konnten, wurden nicht zur Messung herangezogen. Ferner wurde auf eine vergleichbar dichte Granula (bzw. Cytosomen) bei der Zellauswahl geachtet. Weitere Kriterien wurden bereits unter Abschnitt 5.3 beschrieben.

6. MATERIAL UND METHODEN

6.1 DIE VERWENDETEN ZELLINIEN

Für die experimentelle Untersuchung wurden sieben verschiedene Zelllinien verwendet :

- Brown-Pearce-Tumorzellen,
sowie Zellen der Zelllinien mit den Stammindizes :
- A 549
- NCI - H 358
- OS 24
- M 24
- ROS 17/2.8
- ROS 25/1

6.1.1 BROWN-PEARCE-TUMORZELLEN

Zwecks Auswahl einer geeigneten Untersuchungsmethode wurden anfangs Zellen des Brown-Pearce-Tumors benutzt. Es handelt sich hierbei um ein niederdifferenziertes Hodenkarzinom des Kaninchens (42). Dieses Hodenkarzinom zeigt sich bei der Zellkulturhaltung ausgesprochen unempfindlich mit rascher Zunahme der Zellzahl (Generationszeit ca.17 h). Aus diesen beiden Gründen war es möglich, mit den Brown - Pearce - Zellen in kurzer Zeit eine Vielzahl von Vorversuchen durchzuführen.

6.1.2 A 549 , NCI - H 358

Diese beiden pathologischen Zellkulturen aus der humanen Lunge sollten dazu dienen, Unterschiede zwischen gesunden und entarteten Zellen in Bezug auf ihr Photofrin II - Aufnahme- und -Abgabeverhalten in vitro aufzuzeigen. Leider ergaben weitere Nachforschungen, daß beide Zelllinien Tumorzellen waren. Die A 549 - Zellen wurden aus dem Explantat eines menschlichen Alveolartumors entwickelt und ähneln in Morphologie und Funktion Pneumocyten des Typs II. Diese menschlichen Adenokarzinomzellen der Lunge synthetisieren, speichern in Zytosomen und sezernieren Phospholipide, die als Surfactant normalerweise das Alveolarlumen auskleiden und eine Atelektasenbildung verhindern (89).

Aus einem anderen menschlichen Lungentumor, einem bronchiolo - alveolarem Karzinom, wurde die Zelllinie NCI- H 358 gezüchtet. Diese Zellen zeigen ebenfalls die charakteristischen Merkmale der Pneumocyten des Typs II.

6.1.3 OS 24 , M 24

Bei den OS 24 - Zellen handelt es sich um Osteosarkomzellen einer NMRI Maus¹⁾. Dieses Osteosarkom ist in vivo durch das radioaktive Radium - Isotop 224 induziert worden. Die Zelllinie M 24 besteht aus Muskelzellen derselben NMRI Maus.

¹⁾ NMRI = Naval Medical Research Institut

6.1.4 ROS 17/2.8 , ROS 25/1

Beide Zelllinien entstammen einer ACI¹⁾-Ratte. Die ROS 17/2.8 Zellen entstammen einem spontan entstandenen transplantablen Osteosarkom und besitzen Osteoblasten-ähnliche Eigenschaften mit Alkalischer - Phosphatase - Aktivität. Diese Zellen repräsentieren die malignen transformierten Zellen. Bei einer Überprüfung der Malignität führten die ROS 17/2.8 - Zellen innerhalb von 3 Wochen in 100 % der Fälle zu einem schnell wachsenden Osteosarkom (histologisch gesichert) bei ACI - Ratten (Dr.Jörg Schmidt, Pathologie der GSF in Neuherberg). Die ROS 17/2.8 - Zellen besitzen also noch ihre ursprünglichen Eigenschaften.

ROS 25/1 ist eine Zelllinie, die aus demselben spontanen Osteosarkom der ACI-Ratte isoliert wurde wie die ROS 17/2.8 - Zellen. Die ROS 25/1 zeigen morphologisch das Bild von Fibroblasten und weisen keine meßbare Alkalische - Phosphatase-Aktivität auf. Diese geklonten Rattenfibroblasten sind nicht differenziert (86) und sollen die vergleichbare Normalzelllinie repräsentieren, wenngleich die Dignität dieser Zellen unklar ist.

Die ROS-Zellen, 17/2.8 und 25/1, und die Zellen OS 24 und M 24 der NMRI Maus wurden freundlicherweise von den Herren Dr.J.Schmidt und Prof.Dr.A.Luz aus der Abteilung für Patholo-

¹⁾ ACI = August x Copenhagen Irish
Stamm wurde 1926 an der Columbia University gezüchtet

gie der GSF in Neuherberg bei München zur Verfügung gestellt. Von Herrn Dr. F.J. Wiebel aus der toxikologischen Abteilung desselben Institutes wurden die beiden humanen Tumorkulturen aus der Lunge A 549 und NCI - H 358 vermittelt. Die Zellen des Brown-Pearce-Tumors stammen von Herrn Prof. Dr. Gericke, Fa. Hoechst, Frankfurt / Main.

6.2 ZELLKULTURHALTUNG UND VERSUCHSVORBEREITUNG

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Petrischalen und bei gleichen Brutschrankbedingungen angezüchtet (Abb. 07).

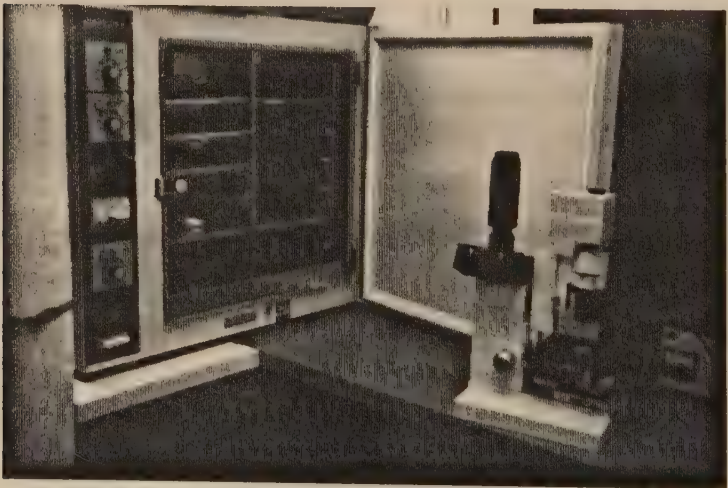


Abb. 07 : Brutschrank mit Zellkulturen und Mikroskop im Zelllabor. Die links im Brutschrank befindlichen Petrischalen enthalten HpD - haltige Zellen und sind mittels Aluminiumfolie vor Licht geschützt.

Bei einer Bebrütungstemperatur von 37 °C und unter einer 5 % igen CO₂ - Atmosphäre (95 % Luft) konnten die Zellkulturen bis zur gewünschten Zelldichte heranwachsen. Der pH - Wert des Mediums wurde mittels Phenolrot (Phenolsulfonphthalein) kontrolliert. Der Farbumschlag von Phenolrot wird beeinflusst durch die Phenolrotkonzentration, Fremdsalze und Lösungsmittel, Proteine und andere Kolloide und durch die Temperatur. Das Umschlagsintervall liegt im pH-Wertbereich von 6,4 ÷ 8,4 und ist für die Belange der Zellkulturhaltung ausreichend genau (78). Genauere Überprüfungen des Medium - pH-Wertes mittels Test - Streifen - Methode ergaben pH-Wert - Schwankungen von 7,2 bis 7,6 durch Zellwachstum, Mediumwechsel und während der Präparation vor den Messungen. Je nach Zellart wurden unterschiedliche Kulturmedien verwendet :

Brown-Pearce-Karzinom : RPMI 1640 - Medium ¹⁾ mit
10 % foetalem Kälberserum ²⁾ (FKS)
1 % Penicillin / Streptomycin¹⁾
1 % L-Glutamin²⁾ als Zusätze

NCI - H 358 : RPMI 1640 - Medium (Zusätze wie
beim Brown-Pearce-Karzinom)

¹⁾ Fa. seromed, Biochrom KG, Berlin

²⁾ Fa. Boehringer, Mannheim

A 549 : DMEM - Medium¹⁾, das
10 % iges foetales Kälberserum (FKS),
1 % Penicillin / Streptomycin und
2 % L-Glutamin als Zusätze enthält.

OS 24 : DMEM - Medium mit den Zusätzen
10 % iges FKS
1 % Penicillin / Streptomycin
2 % L-Glutamin
3,7 g/l NaHCO₃
4,5 g/l D-Glucose

M 24 : DMEM - Medium
(Zusätze siehe OS 24)

ROS 17/2.8 : Ham's F 12 - Medium¹⁾ mit den Zusätzen
10 % iges FKS
1 % Penicillin / Streptomycin
1 % L-Glutamin
1,176 g/l NaHCO₃
10 mg/l Phenolrot

ROS 25/1 : Ham's F 12 - Medium
(Zusätze siehe ROS 17/2.8)

¹⁾ Fa. seromed, Biochrom KG, Berlin

Alle Zelllinien wurden nach dem Anzüchten mittels Trypsin aus der alten Zellkulturschale gelöst, 5 Minuten lang bei 10000 Umdrehungen pro Minute schonend zentrifugiert und sehr dünn in dem der Zelle entsprechenden Medium (s.o.) in einer neuen Petrischale ausgesät. In der Regel zwei Tage später hafteten die Mehrzahl der Zellen fest am Boden der Petrischale (Hersteller Fa.Falcon ; Schalendurchmesser 60 mm) und wurden mittels Mediumwechsel mit einem Medium versetzt, das Photofrin II in einer Konzentration von 10 μ l oder 20 μ l Ph II auf 5 ml Medium enthielt und in dem der Gehalt an foetalem Kälberserum nur noch 2 % (vorher 10 %) betrug. Die Reduktion des Gehaltes an foetalem Kälberserum und damit eine Reduktion des Zellwachstums war notwendig, um auch noch fünf Tage nach dem Versetzen mit Photofrin II - haltigem Medium (längste Versuchszeit) einzelne Zellen messen zu können.

Vor der Messung unter dem Mikroskop wurde das Medium der jeweiligen Zellkulturschale abgesaugt. Die in der Schale haftenden Zellen wurden zweimal mit Hank'scher Lösung (Fa. seromed Biochrom KG, Berlin) durch mehrmaliges Schwenken der Schale gewaschen. In Hank'scher Lösung wurden die Zellen auch zur Meßapparatur transportiert. Neben der Meßapparatur wurden die Zellen mikroskopgerecht aufbereitet: Die Petrischale wurde durch einfaches Seitwärtsschwenken dekantiert, so daß nur noch ein Flüssigkeitsfilm verblieb. Nun wurde ein großes Deckplättchen zur Vermeidung eines Platzens der Zellen ganz

vorsichtig in die Petrischale gelegt und diese Zellkulturschale unter das Mikroskop gegeben. Unter schwacher Durchlichtbeleuchtung wurden einzelne Zellen aufgesucht, und die Fluoreszenz dann bei ausschließlicher Auflichtbeleuchtung im Wellenlängenbereich von (400 ± 60) nm (bedingt durch die Quecksilber-Emissionslinien schwerpunktmäßig bei 405 nm und 436 nm) gemessen.

Der Meßbeginn ließ sich nach dem Absaugen des Kulturmediums meist innerhalb von 10 min realisieren. Dabei verblieben die Zellen während der ganzen Prozedur in der Petrischale, in der sie am Boden angewachsen und mit Photofrin II versetzt worden waren. Alle Manipulationen an den Zellkulturen wurden in einem Zellabor unter sterilen Bedingungen vollzogen. Die Arbeiten an den Zellen wurden unter einem Laminar - Flow - Gerät durchgeführt, um in keimfreier Luft arbeiten zu können (Abb. 08).

Immer, wenn mit dem lichtempfindlichen Photofrin II bzw. mit Zellen, die Photofrin II enthielten, gearbeitet wurde, wurde streng auf eine nur minimale Raumbelichtung geachtet, und es wurden diese Arbeiten zügig durchgeführt. Alle Petrischalen und Flaschen, die Photofrin II bzw. Photofrin II - haltiges Medium enthielten, wurden des Lichtschutzes wegen sorgfältig und vollständig umschließend in Aluminiumfolie verpackt.



Abb. 08 : Laminar - Flow - Gerät, an dem die Arbeiten an den Zellen durchgeführt wurden. Vorn in der Mitte der Arbeitsplatte liegt eine geöffnete Aluminiumverpackung. Die in dieser Petrischale enthaltenen mit HpD versetzten Zellen konnten auf Grund der Raumbeleuchtung für die Photoaufnahme selbstverständlich nicht mehr weiter verwendet werden.

6.3 PHOTOFRIN II

Bei den Untersuchungen dieser Arbeit wurde die für die Krebstherapie aktivste Komponente des Hämatoporphyrin - Derivates mit der Bezeichnung Dihämatoporphyrinester verwendet. Dihämatoporphyrinester wird vom Hersteller unter dem Handelsnamen Photofrin II vertrieben. Dieses Pharmazeutikum läßt sich aus dem Stoffgemisch HpD durch chromatographische Methoden isolieren.

Photofrin II ist ein isotonisches, steriles Präparat zur intravenösen Injektion am Patienten. Der aktive Bestandteil des Photofrin II liegt in einer Konzentration von 2,5 mg/ml vor. Den Zellen wurde das Pharmakon etwa im Verhältnis 1 zu 1000 mit den entsprechenden Medien verdünnt angeboten. Alle Zellen und Medien, die Photofrin II enthalten, müssen - wie das Pharmakon selbst - im Dunkeln aufbewahrt werden. Bei Lagerung im Dunkeln und zusätzlicher Kühlung auf 0 °C bleibt Photofrin II ca. sechs Monate lang in seinen Eigenschaften stabil.

Um die Auswirkungen eventueller Qualitätsschwankungen des Photofrin II - Präparates auf die Meßergebnisse auszuschließen, wurde für jede der drei Meßserien (Brown-Pearce-Zellen; A 549, NCI - H 358; OS 24, M 24 und ROS 17/2.8 , ROS 25/1) jeweils nur eine Photofrin II - Charge verwendet. Ferner wurden die Messungen der direkt miteinander zu vergleichenden

Zelllinien (OS 24 , M 24 und ROS 17/2.8 , ROS 25/1) alternierend durchgeführt, um auch einer möglichen zeitbedingten Photofrin II - Veränderung vorzubeugen.

6.4 DAS PHASENKONTRASTVERFAHREN

Beobachtet man ungefärbte Dünnschnitte von zytologischen und histologischen Präparaten im Mikroskop, so erscheinen die Bilder oft nahezu leer und ohne Struktur. In vielen Fällen kann man zwar durch Einfärben die einzelnen Strukturen des Objektes hervorheben; dabei wird jedoch in den natürlichen Zustand des Präparates eingegriffen. Für mikroskopische Betrachtungen von lebenden Präparaten, wie z.B. Viren, Bakterien, Blutzellen oder anderen Einzelzellen entstanden im Laufe der Zeit mehrere Verfahren, durch die man ungefärbte Strukturen sichtbar machen kann. Dazu gehört neben der Dunkelfeldmikroskopie, der Fluoreszenzmikroskopie oder der Interferenzmikroskopie auch das Phasenkontrastverfahren.

Bei der Phasenkontrastmikroskopie benutzt man den physikalischen Effekt, daß durch ein transparentes Objekt wie z.B. Zellen hindurchtretende Lichtwellen unterschiedliche Phasenverschiebungen erfahren. So bleiben Lichtwellen, die den optisch dichteren Zellkern durchlaufen, in der Phase zurück ge-

genüber den Wellen, die das optisch dünnere Umfeld durchsetzen. Diese Veränderung in der Phasenlage kann jedoch mit dem menschlichen Auge nicht wahrgenommen werden, da das Auge nur Unterschiede in der Intensität (Helligkeit) und der Wellenlänge (Farbe) registriert, nicht jedoch Wellenzüge unterschiedlicher Phase (9).

Das Phasenkontrastverfahren nach Zernike, der dafür 1953 den Nobelpreis für Physik erhielt, gestattet die Umwandlung kontrastarmer Strukturen von Phasenobjekten in kontrastreiche Bilder.

Schematisch gesehen liegt folgende Anordnung vor (Abb.09) :

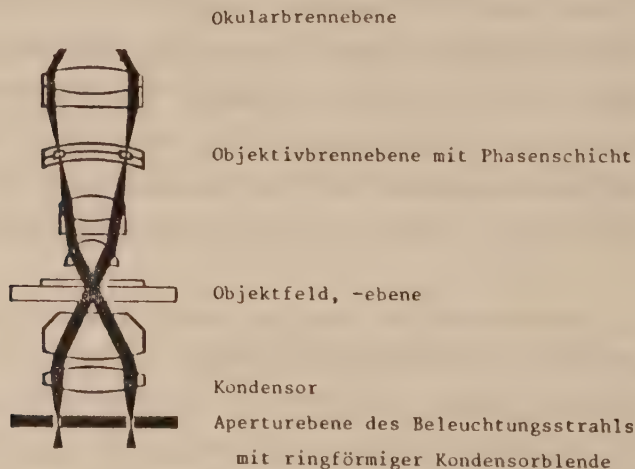


Abb. 09 : Strahlengang beim Durchlicht - Phasenkontrast - Verfahren

In der Aperturebene des Beleuchtungsstrahls befindet sich eine meist ringförmige Blende. Dem Bild dieser Blende entspricht eine sogenannte Phasenschicht, die in der Objektivbrennebene liegt und ebenfalls wie die Blende ringförmig ist. In der Phasenschicht wird die Phase des durchtretenden Lichtes gegenüber der Umgebung um einen bestimmten Betrag verzögert und die Lichtintensität in geeigneter Weise geschwächt.

Wenn das Objektfeld leer ist, trifft das durch die ringförmige Kondensorblende durchtretende Licht ohne merkliche Beugungsverluste auch auf die ringförmige Phasenschicht in der Brennebene des Objektivs. Die Intensitätsschwächung und Phasenverschiebung, die durch das Phasenplättchen (Phasenschicht) hervorgerufen wird, ist für das Bild in der Okularbrennebene ohne Bedeutung. Bringt man nun eine Phasenstruktur in die Objektebene, so erfährt das direkt durch das Phasenplättchen gehende Licht die gleiche Veränderung wie das Licht des Umfeldes. Das an der Phasenstruktur des Objektes abgelenkte Licht aber geht am Phasenplättchen vorbei und hat nunmehr gegen das direkte Licht einen Phasen- und Intensitätsunterschied. Dieses primäre Beugungsbild wird zu einer sekundären Interferenzerscheinung, dem Bild des Gegenstandes in der Okularbrennebene, zusammengesetzt, das vom Auge wahrgenommen wird.

Wird nun das Licht durch das Phasenplättchen um ein Viertel der Wellenlänge entsprechend 90° in der Phase voreilend ver-

schoben und schwächt es gleichzeitig das Licht, dann entsteht bei der Überlagerung von direktem und gebeugtem Licht im Bildfeld ein positiver Phasenkontrast. Ein positiver Phasenkontrast liegt vor, wenn Objekte, die eine größere Brechzahl als ihre Umgebung haben, im Bild dunkler und Objekte mit kleinerer Brechzahl heller als das Umfeld erscheinen. Verschiebt der Phasenring das direkte Licht um ein Viertel der Wellenlänge, so entsteht ein negativer Phasenkontrast mit den umgekehrten Kontrastverhältnissen.

Durch diesen Eingriff in den Strahlengang des Mikroskops wird die Phasenstruktur des Objekts in ein Amplitudenbild übersetzt. Diese Methode ist sehr empfindlich, da Phasenunterschiede von wenigen Graden in deutlich sichtbare Helligkeitsunterschiede umgewandelt werden.

Beim Phasenkontrastmikroskopieren muß man einige Aspekte beachten:

- Phasenobjekte sollen dünn sein, da die tiefer und höher liegenden Objektdetails eine störende Phasenverschiebung erzeugen und außerdem infolge der ringförmigen Beleuchtungsapertur zu ringförmigen Zerstreuungsfiguren führen.
- Das Präparat soll keine großen Brechungsunterschiede aufweisen.
- Die zu beobachtenden Objektdetails sollen recht fein strukturiert sein.

- Der Haloeffekt ist ein Nachteil des Phasenkontrastverfahrens.

Beim Haloeffekt wird bei positivem Phasenkontrast z.B. der Rand eines flächigen Objektteils mit größerer Brechzahl außen von einem hellen Lichthof und innen von einem dunklen Saum umgeben. Die Verhältnisse sind bei negativem Phasenkontrast umgekehrt. Durch den Haloeffekt werden flächenhafte Objektdetails nicht immer ganz größengetreu wiedergegeben.

- .. Als Einschlußmittel bei Kurzzeitpräparaten für ungefärbte biologische Objekte benutzt man zweckmäßigerweise physikalische Medien (9, 61), wie auch in dieser Arbeit geschehen.

6.5 ANREGUNGSLICHTQUELLE

Das Maximum der Exzitation des Photofrin II liegt beim Wellenlängenbereich von 405 nm. Dieses violette Licht penetriert bei weitem nicht so tief in Gewebe wie das ebenfalls von Photofrin II absorbierte rote Licht (siehe Kapitel 2). Da aber in den Versuchen zu dieser Arbeit einzelne, nicht übereinanderliegende Zellen untersucht wurden, stellte die Eindringtiefe des Lichtes keine Limitierung des Verfahrens dar. Entscheidend war für die Versuchsdurchführung vielmehr, daß sich bei Anregung der roten Fluoreszenz des Photofrin II mit einem violetten Auflichtilluminator reflektiertes und gestreutes violettes Licht bei der Messung der roten Fluoreszenz herausfiltern läßt und daß die Absorption des violetten Lichtes relativ hoch ist. Eine ausreichende Strahlungsintensität zur Anregung der Photofrin II - Fluoreszenz kann bereits von einer Quecksilber - Höchstdrucklampe des Typs HBO mit 50 Watt aufgebracht werden.

Der Spektralbereich dieser Quecksilberlampe mußte noch gefiltert werden, um den gewünschten Wellenlängenbereich von 405 nm zur Anregung der Photofrin II - Fluoreszenz weitgehend zu isolieren. Zur Schonung von Präparat und Filtern wurde in das Lampengehäuse ein Wärmeschutzfilter eingebaut, der UV - Licht absorbiert. Des weiteren wurde ein Dichromatischer Teiler, vom Hersteller Leitz Wetzlar GmbH als Filterblock G bezeichnet, verwendet.

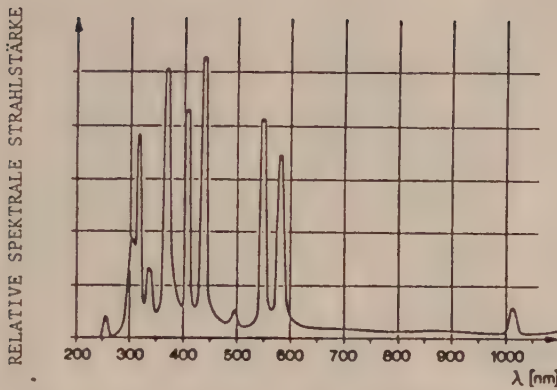


Abb. 10 : Strahlungsspektrum der Anregungslichtquelle einer Quecksilber - Höchstdrucklampe des Typs HBO mit 50 Watt (nach Angaben des Herstellers (61))

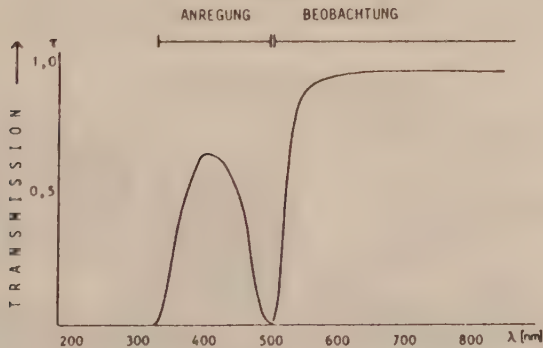


Abb. 11 : Durchlässigkeitskurve des Dichromatischen Teilers¹¹

¹¹ Filterblock G :
Anregungsbereich
Anregungsfilter
Teilerspiegel
Sperrfilter
Filtertyp

UV + Violett + Blau
Bandpaßfilter 350 + 460
Reflexions-Kurzpaßfilter 510
Langpaßfilter 515
Anregung Farbglasfilter (Kombination)
Sperrung Folienfilter (Kombination)

Vom Emissionsspektrum der verwendeten Quecksilber - Höchst-
drucklampe verbleibt nach dem Zwischenschalten des Dichroma-
tischen Teilers und Wärmeschutzfilters noch ein Anregungs-
spektrum mit zwei Maxima von 405 nm (violetter Bereich) und
von 436 nm (blaues Licht). Dieses Spektrum wurde zur Exzita-
tion des in den Zellen enthaltenen Photofrin II verwendet.

6.6 MEßANORDNUNG UND MEßDURCHFÜHRUNG

Das Ziel der Messungen war die Bestimmung des jeweiligen in-
trazellulären Photofrin II - Gehaltes. Dazu erfolgten zeit-
aufgelöste, mikroskopische Fluoreszenzmessungen : Das Zell-

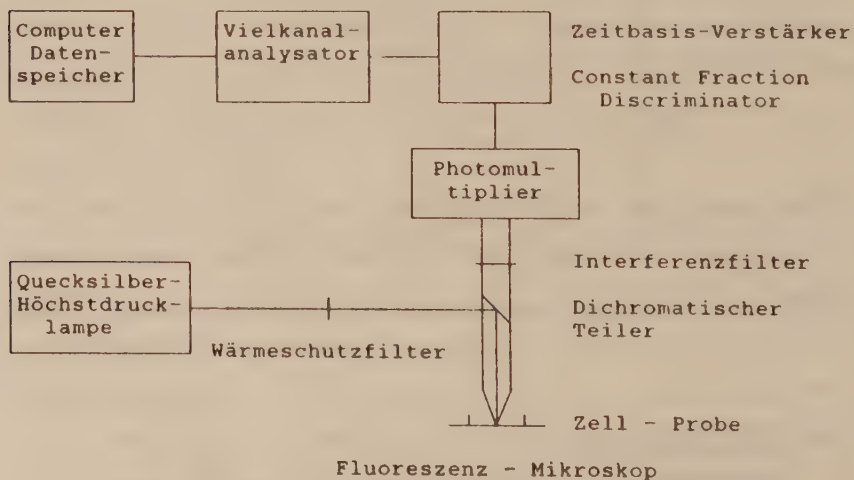


Abb. 12 : Prinzip der Meßanordnung

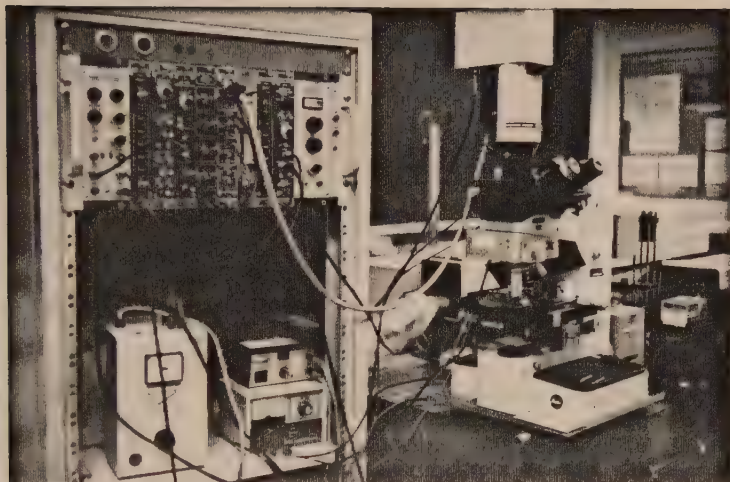


Abb. 13 : Abgebildet ist das zu den Messungen verwendete Mikroskop mit der technischen Zusatzausrüstung wie Photomultiplier, Constant Fraction Discriminator, Zeitbasis-Verstärker u.a. (vergleiche Abb. 12)

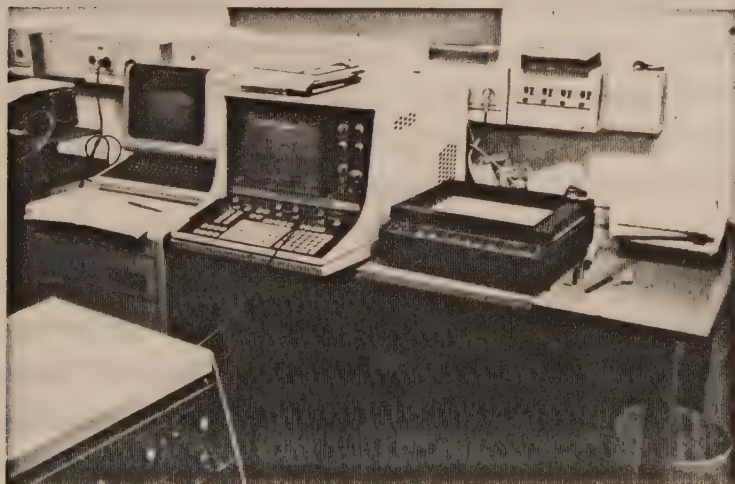


Abb. 14 : Abgebildet sind die Geräte zum Aufzeichnen, Speichern und Auswerten der Meßwerte wie z.B. Vielkanalanalysator, Computer, Datenspeicher und Plotter.

präparat wurde eingespannt in ein hochleistungsfähiges Mikroskop " Orthoplan " der Fa. Leitz, dem ein Mikroskop - Photometer " Leitz MPU compact " aufgesetzt ist (siehe Abb.13). Unter minimaler Durchlichtbeleuchtung mit Phasenkontrast wurde eine geeignete Zelle ausgewählt und eingestellt. Sofort anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung dieser Zelle unter fortwährender Auflichtbeleuchtung mit einem Anregungsspektrum (Maxima bei 405 nm und 436 nm) aus der oben beschriebenen mit Lichtfiltern versetzten Quecksilberhöchstdrucklampe (vergleiche Abschnitt 6.5). Bei den nächsten Zellen wurde ebenso verfahren. Die Lichtleistung der Quecksilberhöchstdrucklampe wurde mit einem Powermeter zwischen den Messungen regelmäßig kontrolliert und gegebenenfalls mittels Lichtfilterkombination auf den jeweils gewünschten Bereich korrigiert. Das emittierte (fluoreszierte und reflektierte bzw. gestreute) Licht wurde zuerst über einen Dichromatischen Teiler (siehe Abb. 11) geleitet und weiter durch ein Interferenzfilter (IF 650) auf den Lichtwellenbereich von 650 nm $\pm$ 35 nm (rote Photofrin II - Fluoreszenz) begrenzt. Diese Fluoreszenz aus der Zelle wurde auf die Photokathode eines Photomultipliers fokussiert, verstärkt und zeitabhängig vermessen. Ein Vielkanalanalysator stellte sofort die relative Intensität der Fluoreszenzemission als Photonenanzahl (Photon Counts) in Abhängigkeit von der Zeit dar (siehe Abb.14). Dabei wurde die Zahl der Photonen eines Zeitintervalls von 0,6 Sekunden jeweils akkumuliert.

Da die Photokathode verschiedene Lichtquellen, die trotz vorgeschalteter Filter nicht komplett eliminiert werden können, nicht diskriminieren kann, enthalten die primär gemessenen Fluoreszenzemissionsintensitäten der Zellen auch noch störende andere Photonen (Untergrundlichtintensität aus Autofluoreszenz der Zellen ohne Ph II, Lichtreflexion, minimalste Raumbelichtung). Mittels jeweils gleichgearteter Kontrollmessungen an Photofrin II - freien Zellen, wie in Abb.17 dargestellt, läßt sich die Höhe der störenden Photonen bestimmen. Der eigentliche Photofrin II - Fluoreszenzanteil läßt sich nun mittels Subtraktion errechnen und wurde, so aufbereitet, in den Tabellen des Ergebnisteiles (Kapitel 8) aufgenommen.

Berechnet wurden diese Mittelwerte auf die letzte Stelle vor dem Komma. Die entsprechenden Standardabweichungen geben an, wie sehr die einzelnen Meßwerte der verschiedenen Zellen variierten, die in den Mittelwerten zusammengefaßt worden sind. Sie sind ein Maß für die naturbedingten zellulären Schwankungen der Photofrin II - Aufnahme der Zellen einer Zelllinie und beinhalten ferner den durch die Meßapparatur bedingten Fehler. Letzterer betrug bei Messungen von Standardlösungen unter Versuchsbedingungen zwischen 3% und 5%. Die in den Tabellen angegebenen Mittelwerte der relativen Photofrin II - Fluoreszenzintensität enthalten mehr Ziffern, als nach der Standardabweichung als geltende Ziffern bezeichnet werden können, um die statistischen Berechnungen nachvollziehbar zu machen.

6.7 T - TEST FÜR UNVERBUNDENE STICHPROBEN

Die Voraussetzungen für den angewandten Test sind (84, 99):

1. zwei stochastisch unabhängige Stichproben, die
2. normalverteilte, stetige Daten enthalten und
3. das Vorliegen homogener Varianzen bei beiden Grundgesamtheiten

Es handelt sich um unpaarige (=unverbundene) Stichproben, da nicht jeder Beobachtungseinheit (Zelle) der einen Stichprobe genau eine Beobachtungseinheit der anderen Stichprobe zugeordnet ist. Die Meßwerte der Beobachtungseinheiten der verschiedenen Stichproben sind voneinander unabhängig, da jede ausgewählte Zelle entweder der einen oder der anderen Stichprobe zugeordnet und vermessen wurde; meist jedoch wurden in den beiden Stichproben jeweils Zellen zweier verschiedener Zelllinien vermessen und mittels t-Test miteinander verglichen. Wenn aus einem vorangegangenen Ereignis (E1) das Eintreten des folgenden Ereignisses (E2) weder sicher noch unmöglich ist, wenn also die Wahrscheinlichkeit für das Ereignis E2 bei gegebenem Ereignis E1 ebenso groß ist, wie bei nicht gegebenem Ereignis E1, dann liegt Unabhängigkeit der Ereignisse vor. Da man aus einem vorangegangenen Meßwert einen folgenden Meßwert weder sicher bestimmen noch völlig ausschließen kann, sind die aus den Messungen gebildeten Stichproben unabhängig voneinander.

Die bei den durchgeführten Fluoreszenzmessungen anfallenden Meßwerte - es handelt sich um Photonenzahlen pro Zeit - stellen stetige Daten dar. Denn die Werte können zumindest in einem gewissen Intervall jeden beliebigen Wert annehmen. Da die Zahlenwerte der Meßreihen 3 bis 5-stellige ganze Zahlen sind, erscheint die Stetigkeit vielleicht zweifelhaft. Man bedenke jedoch, daß bei einem richtig gemessenem Wert von z.B. 237 der wahre Meßwert zwischen 236,5 bis unter 237,5 liegt. Es liegen also stetige Daten vor.

Zur Überprüfung, ob bei den Meßwerten der einzelnen Stichproben eine Normalverteilung vorliegt, wurde von einigen Meßreihen mit größerem Stichprobenumfang ein Histogramm (Abb.15) gemäß nachstehendem Beispiel gezeichnet:

Meßreihe :

Zahl der Proben: $n = 90$

Zahl der Klassen: $k \approx \sqrt{n} \geq 9$

Klasse	Klassenintervall	Anzahl	relative Häufigkeit
1	1000 - 1199	1	0,011
2	1200 - 1399	2	0,022
3	1400 - 1599	11	0,122
4	1600 - 1799	19	0,211
5	1800 - 1999	26	0,289
6	2000 - 2199	18	0,200
7	2200 - 2399	9	0,100
8	2400 - 2599	2	0,022
9	2600 - 2799	2	0,022

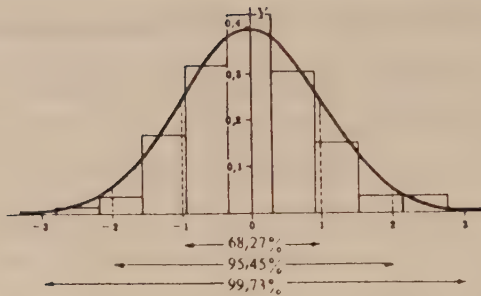


Abb.15 : Vergleich der Häufigkeitsverteilung einer Meßreihe (Histogramm) mit der Gaußschen Normalverteilung (Glockenkurve)

Die Häufigkeitsverteilung des Beispiels zeigt ein fast symmetrisches Histogramm, das der zum Vergleich aufgezeichneten Gaußschen Normalkurve weitgehend entspricht (Abb.15). Eine exakte Übereinstimmung von einer empirisch ermittelten Werteverteilung mit der Normalverteilung wird es streng genommen kaum geben.

Beim t-Test beeinflußt eine Verletzung der Normalitätsannahme nur ganz geringfügig das Signifikanzniveau und damit die Aussagekraft des Testes. Der t-Test ist also sehr robust gegenüber Verletzungen dieser Annahme. Die geringen Abweichungen der Verteilung der gemessenen Werte der untersuchten Stichproben von der Normalverteilung und die geringe Anfälligkeit des t-Testes gegenüber solchen Abweichungen, schränkt die Aussagekraft des angewandten Testverfahrens von dieser Seite her nicht ein.

Eine Anfälligkeit des t-Testes gegenüber inhomogenen Varianzen ist gegeben, wenn die Populationsvarianzen substantiell verschieden sind. Das verwendete Selektionsverfahren (siehe Abschnitt 5.3 und 5.4) läßt solche Unterschiede der Varianzen nicht erwarten. Tatsächlich liegen die Varianzen (das Quadrat der einfachen Standardabweichung) auch meist auf dem gleichen Niveau. In einigen Fällen ist dieses aber nicht der Fall. Wenn die Annahme der Varianzhomogenität nicht erfüllt ist, so hat dies jedoch nur dann einen erheblichen Einfluß auf die Wahrscheinlichkeit einer fehlerhaften Aussage, wenn die beiden Stichprobenumfänge ungleich sind. Auch dieses trifft für einige wenige Fälle zu. Die häufig meist routinemäßig durchgeführte statistische Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit mittels t-Test wird in diesen Fällen sehr fragwürdig.

Die Auswahl der einzelnen vermessenen Zellen innerhalb einer Petrischale erfolgte nur bedingt stochastisch (=zufällig), da an die zu vermessenen Zellen gewisse Kriterien, wie z.B. Zellgröße, Zellage, intrazelluläre Eigenschaften (vergleiche 5.3 und 5.4) gestellt wurden. Die Stichproben sind also im strengen Sinne nicht rein zufällig ausgewählt worden. Folglich sind sie gegenüber rein zufälligen Stichproben durch größere Ähnlichkeit der Stichprobenelemente untereinander und damit eine geringere Standardabweichung charakterisiert. Dieser Effekt könnte also einen signifikanten Mittelwerts-

unterschied vortäuschen (vergleiche Formel zur T-Wert-Bestimmung), und die bei den folgenden Ergebnisdarstellungen angeführten Wahrscheinlichkeits- und Signifikanzaussagen würden streng genommen nicht zutreffen.

Man sollte diese Aussagen als formalisierte Datenbeschreibung auffassen, die neben der tabellarischen und graphischen Darstellung der Meßergebnisse steht und bei ihrer Interpretation helfen soll. Von der vorherigen Formulierung fester Signifikanzschranken (üblicherweise 0,01 oder 0,05) wurde daher auch Abstand genommen. Es wurde vielmehr neben dem berechneten T-Wert (siehe unten) und unter Berücksichtigung des jeweiligen Freiheitsgrades das in einer Tabelle (kritische Werte der t-Verteilung) (99) angegebene jeweils minimal mögliche Signifikanzniveau (Irrtumswahrscheinlichkeit) angegeben. Der T-Wert ist eine Prüfgröße, die mittels oben genannter Tabelle eine Aussage über die wahrscheinliche Richtigkeit einer Hypothese ermöglicht.

Diese Art der Testanwendung würde die Arbeitshypothese mit der Aussage "es besteht ein Unterschied zwischen den Mittelwerten" natürlich immer bestätigen, und die Nullhypothese mit der Aussage "die Mittelwerte sind gleich" immer verwerfen. Eine falsch negative Entscheidung (die Nullhypothese trifft in Wirklichkeit nicht zu, wird aber beibehalten) also ein Fehler 2. Art wäre dann unmöglich, während die Möglichkeit einen Fehler 1. Art also eine falsch positive Entschei-

dung (die Nullhypothese trifft in Wirklichkeit zu, wird aber fälschlich abgelehnt) zu machen, je nach der angegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit (α) auftreten würde. Wie oben bereits dargelegt, soll die statistische Datenbeschreibung mittels Test nur dazu dienen, die aus der graphischen und tabellarischen Darstellung erhobenen Aussagen zu unterstützen oder zu relativieren.

Als Prüfgröße wird in diesem Test ein Quotient, der T-Wert, bestimmt (84, 99).

Der T - Wert dieses Tests berechnet sich nach der Formel :

$$T - \text{Wert} = \frac{\text{Differenz der Mittelwerte}}{\left(\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2} \cdot \frac{\text{SAQ}}{n_1 - 1 + n_2 - 1} \right)^{\frac{1}{2}}}$$

n_1 = Stichprobenumfang des Merkmals 1

n_2 = Stichprobenumfang des Merkmals 2

$n_1 - 1 + n_2 - 1$ = Freiheitsgrad

SAQ = Summe der Abweichungsquadrate = $\sum x_a^2 - (\sum x_a)^2/n$

SAQ = Summe der quadrierten Einzelwerte -

(Summe der Einzelwerte)²/Fallzahl

7. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

7.1 BROWN - PEARCE - ZELLEN

Alle Untersuchungen an den Brown - Pearce - Tumorzellen erfolgten entsprechend dem oben (6.2 , 6.6) beschriebenen Ablauf. Bei dieser Zelllinie wurden jedoch sowohl die Zellselektion (Durchlichthellfeldverfahren) als auch die Messungen (Auflichtfluoreszenzverfahren) über ein Fluoreszenz - Objektiv des Mikroskops durchgeführt. Diese Zellen des Kaninchens wurden, nachdem sie am Boden der Petrischale fest hafteten, mit Photofrin II - haltigem Medium versetzt (2 μ l Photofrin II pro ml Medium). Die Bestrahlung der Zellen erfolgte über ein rundes Fenster, das in die Zellebene abgebildet einen Durchmesser von 160 μ m ergab, mit einer Lichtleistungsichte von 4,5 mW/mm². Die einzelnen Zellen wurden nach Selektion (Zelldurchmesser 15 μ m $\pm$ 1 μ m) über ein quadratisches Meßfenster der Kantenlänge 33 μ m vermessen, das in der Mitte der bestrahlten Fläche lag. So war sichergestellt, daß alle gemessenen Zellabschnitte auch bestrahlt wurden. (Vergleiche Zellbilder aus Abschnitt 8.5)

7.1.1 AUFNAHME VON PHOTOFRIN II

Um einen Überblick über den Einfluß der Einwirkungsdauer zu erhalten, wurden die Zellen dem Photofrin II - haltigen Medium während zweier verschiedener Einwirkungszeiten, quasi

Inkubationszeiten, ausgesetzt und untersucht.

Einer Petrischale mit Brown - Pearce - Zellen wurde Photofrin II - haltiges Medium für 24 Stunden angeboten, in einer anderen Zellschale waren die Zellen dem Medium 48 Stunden lang ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben (6.2, 6.6) aufbereitet und vermessen.

Da die Zellen besonders am Anfang der Bestrahlungszeit sehr schnell ausbleichen, d.h. die Fluoreszenzintensität schnell abnimmt (vergleiche Abb. 16 und 17 im Abschnitt 8.1.1.2), ist es wichtig, immer nur zu Beginn der Zellbestrahlung eine kurze, gleich lange Zeit (gewählt wurden hier 6 Sekunden) zu messen. Nur bisher nicht bestrahlte Zellen dürfen daher gemessen werden. Auch dürfen keine Zellen, die einer bereits vermessenen Zelle benachbart liegen, zu einer Messung ausgewählt werden. Denn durch das Bestrahlungsfenster, das größer als das Meßfenster ist (siehe 7.1), werden auch diese Zellen bereits partiell mitbestrahlt und weisen daher nach erneuter Anregung nicht mehr ihre ursprüngliche Fluoreszenzintensität auf.

7.1.2 PHOTOFRIN II - ABGABE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT

Am Boden der Petrischale fest haftende Brown - Pearce - Tumorzellen wurden mit Photofrin II - haltigem Medium versetzt. Nach 24 Stunden Einwirkzeit wurde das Photofrin II - haltige Medium entfernt, und die Zellen wurden wieder mit Medium ohne

Photofrin II überschichtet. Danach wurden die Zellen zu bestimmten Zeiten unter dem Mikroskop bestrahlt und ihre Fluoreszenz vermessen. Aufsummiert wurde jeweils über die ersten 6 Bestrahlungssekunden.

7.2 NCI - H 358 UND A 549 - ZELLEN

Beide Zelllinien stammen aus menschlichen Alveolartumoren und wurden, wie unter 6.2 und 6.6 beschrieben ist, behandelt und vorbereitet. Sie erhielten das Photofrin II in einer Konzentration von 2 μl Photofrin II pro ml Medium angeboten. Die Zellbestrahlung erfolgte über ein rundes Fenster, das in die Zellebene abgebildet einen Durchmesser von 160 μm ergab, mit einer Lichtleistungsdichte von 7 mW/mm^2 . In der Mitte dieser bestrahlten Fläche befand sich das quadratische Meßfenster mit einer Seitenlänge von 66 μm .

7.2.1 PHOTOFRIN II - AUFNAHME IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT

Zu beiden Zelllinien wurde eine Meßserie durchgeführt, die eine Darstellung der Photofrin II - Aufnahme dieser Zellen in Abhängigkeit von der Zeit ermöglichte. Die Zellen wurden dem Photofrin II - haltigen Medium unterschiedlich lange ausgesetzt (Einwirkzeit) und nach oben beschriebener Vorbereitung einzeln gemessen. Die Meßwerte geben die Summe der re-

lativen Photofrin II - Fluoreszenz in den ersten 6 Sekunden der Bestrahlungszeit nach der jeweiligen Einwirkzeit an.

7.2.2 PHOTOFRIN II - ABGABE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT

Bei diesen Versuchen wurden die Zellen für 24 bzw. 48 Stunden mit Photofrin II inkubiert. Nach dieser Einwirkzeit wurde das Photofrin II - haltige Medium gegen ein Photofrin II - freies Medium ausgetauscht. Bei einem Teil der Petrischalen wurde das Photofrin II - freie Medium alle 24 Stunden wie auch noch einmal 2 Stunden vor der Messung gewechselt. Diese Differenzierung in Zellschalen mit und ohne Mediumwechsel wurde erstmalig ab einer Abgabezeit von 6 Stunden vorgenommen.

7.3 OS 24 UND M 24 - ZELLEN

7.3.1 PHARMAKOKINETIK

Die OS 24- wie auch die M 24-Zellen wurden mit DMEM - Medium versetzt, das Photofrin II in einer Konzentration von 4 μ l pro 1 ml Medium enthielt. Die Zellbestrahlung erfolgte über ein kreisrundes Fenster, das abgebildet in die Zellebene einen Durchmesser von 100 μ m hatte, mit einer Intensität von

2 mW/mm². Beobachtet wurden die Zellen mit einem Phasenkontrastobjektiv. Das quadratische Meßfenster hatte eine Seitenlänge von 64 µm. Für beide Zelllinien wurden völlig gleiche externe Parameter gewählt; und die beiden Zellarten wurden alternierend gemessen, um den Einfluß möglicherweise nicht erkannter externer Zufälle gering zu halten. Die Meßwerte ergeben sich durch Akkumulation der relativen Photofrin II - Fluoreszenz über die ersten 3 Sekunden der Bestrahlungszeit.

7.3.2 EINFLUß DER ZELLAGE ZUM ZELLVERBAND

Es wird untersucht, ob die Lage einzelner Zellen zum Zellverband einen Einfluß auf ihr Photofrin II - Speicherungsverhalten hat. Unterschieden wurden zwei Zellgruppen : Zellen, die isoliert lagen oder nur über einen punktuellen Kontakt zu einer Nachbarzelle verfügten, bildeten die Gruppe " dünne Zellage " ; Zellen, die durch das Mikroskop betrachtet mindestens mit einem Drittel ihrer Zellwand andere Zellen kontaktierten, aber dennoch durch Ausblenden der Nachbarzellen einzeln gemessen werden konnten, bildeten die Gruppe " dichte Zellage ". Ein Monolayer lag mit Sicherheit in jedem Fall vor.

Für beide Zelllinien OS 24 und M 24 wurde unter diesem Aspekt jeweils eine kurze Photofrin II - Abgabekurve erstellt, nachdem die Zellen für 24 Stunden mit Photofrin II inkubiert

worden waren. Bei der Zellauswahl zur Messung wurde hier nicht auf eine gleiche Zellgröße der OS 24 gegenüber den M 24 geachtet. Ein Vergleich zwischen beiden Zelllinien ist bei diesem Versuch folglich nicht möglich.

7.4 ROS 17/2.8 UND ROS 25/1 ZELLEN

Bei den vergleichenden Untersuchungen wurden für beide Zelllinien die gleichen äußeren Parameter gewählt :

Zum Inkubieren wurden beide Zelllinien mit Ham's F 12 - Medium versetzt, das neben anderen Zusätzen Photofrin II in einer Konzentration von 4 μ l Photofrin II pro ml Medium enthielt. Die Mikroskopeinstellung entsprach der Einstellung bei der Meßreihe der OS 24 und M 24 Zellen. Die Zellbestrahlung während der Messung erfolgte über ein kreisrundes Bestrahlungsfenster, das in die Zellebene abgebildet einen Durchmesser von 100 μ m ergab mit einer Intensität von 0,5 mW/mm². Das quadratische Meßfenster, in der Mitte des Bestrahlungsbereiches gelegen, hatte eine Seitenlänge von 64 μ m. Die Meßwerte geben jeweils die Summe der relativen Photofrin II - Fluoreszenz in den ersten 3 Sekunden der Bestrahlungszeit an.

7.5 INTRAZELLULÄRE PHOTOFRIN II - VERTEILUNG,
PHOTOGRAPHISCH DOKUMENTIERT

Während der vorangegangenen Zellmessungen ließen sich einige interessante Beobachtungen machen, die in diesem Abschnitt anhand von einigen ausgewählten Photographien beschrieben werden.

Die Bestrahlungsmodalitäten und die mikroskopischen Einstellungen bei den Fluoreszenzaufnahmen entsprechen denen der vorangegangenen Experimente. Die Durchlichtaufnahmen erforderten eine andere Filterkombination. Es wurde ein Neutralfilterblock mit dem Teilerspigel 400 der Fa. Leitz Wetzlar GmbH verwendet.

8. ERGEBNISSE

8.1 BROWN - PEARCE - ZELLEN

8.1.1 AUFNAHME VON PHOTOFRIN II

8.1.1.1 PHOTOFRIN II - AUFNAHME IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT

In der *Tabelle 01* sind die Mittelwerte der Photofrin II - Fluoreszenzintensität von Brown - Pearce - Tumorzellen in Abhängigkeit von der Photofrin II - Einwirkzeit dargestellt. Für die Inkubationszeit von 0 Stunden, also kein Kontakt mit dem Photosensibilisator, wurden 8 Zellen vermessen. Als Mittelwert dieser 8 Meßwerte, die nur gering voneinander abweichen, errechnet sich ein Wert von 50 Einheiten relativer Photofrin II - Fluoreszenzintensität mit einer Standardabweichung von 6. Diese 50 Einheiten sind die Summe von Autofluoreszenz, minimalster Raumbelichtung usw. (vergleiche Abschnitt 6.6), die als unerwünschte, aber unvermeidbare, Meßwertkomponente von allen Meßwerten der Tabelle bereits abgezogen worden ist.

Tabelle 01 : Photofrin II - Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit

Ph II - Einwirkzeit in Stunden	Anzahl der Zellen bzw. Messungen	Mittelwert der relativen Ph II - Fluoreszenzintensität	Standard - abweichung
0	8	0	6
24	6	237	80
48	8	301	90

Zum parametrischen Feststellen von Mittelwertdifferenzen dieser Meßwerte wurde der t - Test für unverbundene Stichproben herangezogen (84, 99). (Vergleiche Abschnitt 6.7)

In dieser Untersuchung ergab sich ein T - Wert von 1,378 . Vergleicht man diesen Wert mit der Tabelle über die Signifikanzschranken der t - Verteilung, so läßt sich der Mittelwertunterschied der Fluoreszenz zwischen den Zellen, die 24 Stunden dem Photofrin II ausgesetzt waren, und den Zellen, auf die Photofrin II 48 Stunden einwirkte, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 20 % als signifikant bezeichnen. Die Brown - Pearce - Zellen speichern also mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 20 % nach 48 Stunden Photofrin II-Einwirkzeit mehr Photofrin II als nach einer Einwirkzeit von 24 Stunden. Bei dieser hohen Irrtumswahrscheinlichkeit sollte man jedoch nur von einer tendenziell höheren Photofrin II - Speicherung nach 48 h gegenüber 24 h Inkubationszeit sprechen.

8.1.1.2 UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS AUSBLEICHVERHALTEN VON PHOTOFRIN II - HALTIGEN ZELLEN WÄHREND DAUERBELEUCHTUNG

In Abbildung 16 ist die Fluoreszenzabnahme einer für 24 Stunden mit Photofrin II versetzten Brown - Pearce - Tumorzelle über etwa 10 Minuten aufgezeichnet , die während

der Messung durchgehend mit einer Lichtleistungsdichte von $4,5 \text{ mW/mm}^2$ bestrahlt wurde.

Die gleiche Messung wurde auch mit Brown - Pearce - Zellen durchgeführt, die dem Photofrin II für 48 Stunden ausgesetzt waren. Zum Vergleich wurden weiter auch Brown - Pearce - Zellen untersucht, die nicht mit Photofrin II - haltigem Medium versetzt waren. (Abb.17)

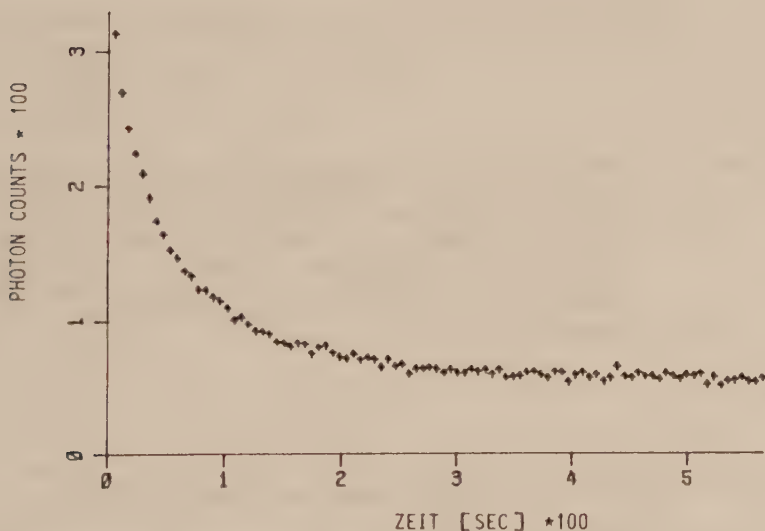


Abb.16 : Darstellung der relativen Fluoreszenzintensität (photon counts) in Abhängigkeit von der Zeit für das Ausbleichverhalten einer Brown-Pearce-Zelle, die für 24 Stunden einer Photofrin II - Konzentration von $2 \mu\text{l Ph II pro ml Medium}$ ausgesetzt war und über die gesamte Meßzeit mit einer Lichtleistungsdichte von $4,5 \text{ mW/mm}^2$ bestrahlt wurde.

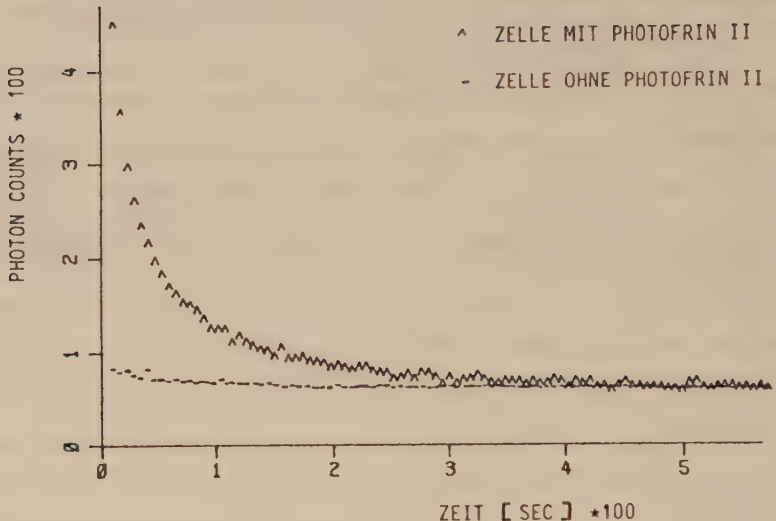


Abb. 17 : Darstellung der relativen Fluoreszenzintensität (photon counts) in Abhängigkeit von der Zeit für das Ausbleichverhalten einer Brown-Pearce - Zelle, auf die Photofrin II über 48 Stunden einwirkte, im Vergleich zu einer Brown - Pearce - Zelle ohne Einwirkung von Photofrin II. Über die gesamte Meßzeit wurde mit einer Lichtleistungsdichte von $4,5 \text{ mW/mm}^2$ bestrahlt.

Aus diesen Fluoreszenzabklingkurven (Abb.16 und 17) ist deutlich zu erkennen, daß die Autofluoreszenz der Zelle (Zelle ohne Photofrin II) nahezu konstant bleibt, während die mit Photofrin II versetzten Zellen ein mit der Zeit starkes Abklingen der deutlich höheren Anfangs - Fluoreszenzintensität aufweisen. Diese Fluoreszenz ist auf Photofrin II zurückzu-

führen. Nach etwa 300 Sekunden Lichtbestrahlung ist die zelluläre Fluoreszenzintensität der Zelle mit Photofrin II auf das Niveau der Zelle ohne Photofrin II abgefallen, so daß man annehmen muß, daß die fluoreszierenden Bestandteile des Photofrin II in nicht fluoreszierende Verbindungen umgewandelt wurden. Deutlich läßt sich aus dem Kurvenverlauf entnehmen, daß die Fluoreszenzintensität am Ende der Ausbleichkurve einer Photofrin II - haltigen Zelle der Autofluoreszenz dieser Zelle entspricht.

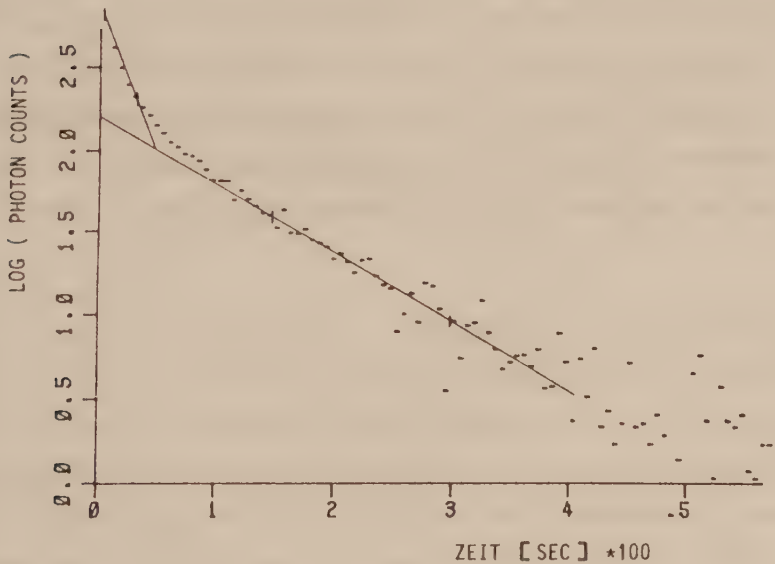


Abb. 18 : Halblogarithmische Darstellung der in Abb.17 abgebildeten Kurve der Zelle mit Photofrin II nach Subtraktion der zellulären Autofluoreszenz und des Streulichtes.

8.1.1.3 HALBWERTSZEITEN DES PHOTOFRIN II - AUSBLEICHENS

Um eventuelle Unterschiede im Fluoreszenzabklingverhalten zwischen den beiden Meßreihen mit 24 Stunden und 48 Stunden Einwirkungszeit von Photofrin II festzustellen, sind jeweils 9 bzw. 8 Fluoreszenzabklingkurven nach Subtraktion der zellulären Autofluoreszenz und des Streulichts untersucht worden.

An Hand dieser Kurven (*Abb.18*) sind rechnerisch die Halbwertszeiten der Fluoreszenzintensitätsabnahme innerhalb zweier Zeitintervalle ermittelt worden. Das erste kurze Zeitintervall betrifft die 3. bis 29. Meßsekunde und das zweite längere Zeitintervall liegt zwischen der 146. und der 293. Meßsekunde. Dabei ist das Fluoreszenzabklingverhalten des späteren, längeren Zeitintervalls bei der Berechnung des früheren, kürzeren Intervalls subtrahiert worden (*Tabelle 02*).

*Tabelle 02 : Halbwertszeiten des Photofrin II - Ausbleichens
bei einer Lichtleistungsdichte von 4,5 mW/mm²*

Photofrin II - Einwirkzeit in Stunden	Anzahl der Zellen	Mittelwert der Halbwertszeit in Sekunden	Standard - abweichung in Sekunden
24 h :			
-frühes, kurzes Zeitintervall	9	16,2	4,1
-spätes, langes Zeitintervall	9	81,7	11,5
48 h :			
-frühes, kurzes Zeitintervall	8	14,6	2,2
-spätes, langes Zeitintervall	8	78,4	14,5

Für den T - Wert errechnet sich :

- frühes Zeitintervall T = 0,983

- spätes Zeitintervall T = 0,523

Bei der Interpretation dieser Ausbleichhalbwertszeiten mittels t - Test für unverbundene Stichproben läßt sich selbst bei Anwendung der geringen Signifikanzschranke von 0,20 kein signifikanter Unterschied zwischen den Ausbleichhalbwertszeiten der Zellen, die für 24 Stunden dem Photofrin II ausgesetzt waren, verglichen mit den entsprechenden Halbwertszeiten der Zellen, die Photofrin II für 48 Stunden angeboten erhielten, feststellen.

Bei einer Lichtleistungsdichte von $4,5 \text{ mW/mm}^2$ liegen also unabhängig von der Photofrin II - Einwirkzeit (24/48 h) im wesentlichen zwei Ausbleichhalbwertszeiten vor:

$$\tau_1 = 15 \text{ s} \pm 5 \text{ s}$$

$$\tau_2 = 80 \text{ s} \pm 15 \text{ s}$$

8.1.1.4 UNTERSUCHUNG DER AUSBLEICHKURVEN

Wie im Abschnitt 8.1.1.3 beschrieben ist, liegen im wesentlichen zwei Ausbleichhalbwertszeiten unabhängig von der Photofrin II - Einwirkzeit vor, die wahrscheinlich durch zwei unterschiedliche Photofrin II - Komponenten bzw. -Komponentengruppen bedingt sind (59, 87, 88).

Ändert sich nun das Verhältnis dieser beiden Komponenten zueinander in Abhängigkeit von der Photofrin II - Einwirkzeit (24 / 48 h)? Zur Klärung dieser Frage wurden nach Abzug der Zell - Autofluoreszenz und des Streulichts die Integrale der beiden Zeitintervalle (bzw. Komponenten) berechnet, für die die Ausbleichhalbwertszeiten bestimmt wurden. Aus diesen Integralen wurde ein Quotient I (= Intensitätsverhältnis) gebildet (Tabelle 03):

$$I = \frac{\text{Integral der schnell ausbleichenden Komponente}}{\text{Integral der langsam ausbleichenden Komponente}}$$

Tabelle 03 : Intensitätsverhältnis I der schnell ausbleichenden Photofrin II - Komponente zur langsam ausbleichenden Komponente

Photofrin II-Einwirkzeit	Anzahl der Zellen	I	Standardabweichung
24 h	9	0,0978	0,0283
48 h	8	0,0902	0,0282

$$T - \text{Wert} = 0,554$$

Stellt man die Hypothese auf, daß ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden I - Werten besteht, und überprüft dieses mittels t-Test für unverbundene Stichproben, so muß diese Hypothese verworfen werden. Das Verhältnis der schnell ausbleichenden Photofrin II - Komponente zur langsam ausbleichenden Komponente ändert sich für die untersuchten Photofrin II - Einwirkzeiten (24 h / 48 h) nicht.

8.1.2 ABGABE VON PHOTOFRIN II

8.1.2.1 PHOTOFRIN II - ABGABE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT

Die Ergebnisse der Messungen der Photofrin II - Abgabe in Abhängigkeit von der Zeit sind in *Tabelle 04* zusammengefaßt und lassen bei etwa gleichen Stichprobenumfängen (Anzahl der Zellen) eine stetig abnehmende Photofrin II - Fluoreszenzinten-

sität erkennen. Die Standardabweichung nimmt mit kleiner werdenden Fluoreszenzintensitäten erwartungsgemäß ebenfalls ab. Zur Photofrin II - Abgabezeit von 72 Stunden Länge liegt der Stichprobenumfang nur bei 5 Zellen, da durch mikrobielle Verunreinigung der zweiten Kulturschale nur der Inhalt einer Petrischale vermessen werden konnte. Trotz Einhaltung größter Sorgfalt bei den Zellarbeiten ließen sich immer einmal wieder auftretender Befall von Mikroorganismen (Pilzen oder Stäbchen) nicht vermeiden, so daß es bei den Meßserien des öfteren zu Verzögerungen kam.

Tabelle 04: Photofrin II - Abgabe von Brown - Fearce - Zellen

Abgabezeiten	Anzahl der Zellen	Mittelwert der relativen Photofrin II-Fluoreszenz in den ersten 6 Sekunden der Bestrahlungszeit ¹⁾	Standardabweichung
0 h	10	159	38
3 h	9	91	37
6 h	10	55	24
24 h	10	50	9
48 h	11	37	17
72 h	5	29	6

¹⁾ Vom Mittelwert wurde die Autofluoreszenz bzw. das Streulicht bereits abgezogen. (Vergleiche Abschnitt 6.6)

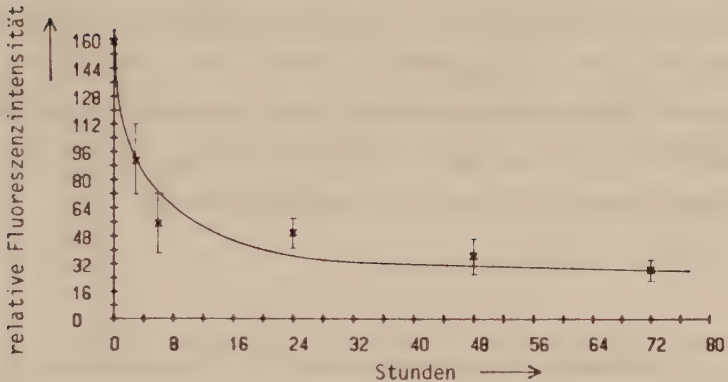


Abb. 19 : Darstellung der relativen Fluoreszenzintensität von Photofrin II-haltigen Brown - Pearce - Tumorzellen, die sich über eine bestimmte Zeit (Ausschleuszeit = Abgabezeit) in Photofrin II-freiem Medium befanden, nachdem sie zuvor 24 Stunden lang dem Photofrin II ausgesetzt waren. (Die Fehlerbalken geben die einfache Standardabweichung wieder.)

Wie in den Kapiteln 4. und 5.4 ausführlich dargelegt wurde, lassen sich aus der zellulären Fluoreszenz Rückschlüsse auf den Photofrin II - Gehalt dieser Zellen ziehen. Die Beziehung zwischen der Fluoreszenzintensität und dem Photofrin II - Gehalt verläuft weitgehend linear. Aus dem Kurvenverlauf in Abb.19 wird deutlich, daß die Brown - Pearce - Zellen nach 24 Stunden Ph II - Einwirkzeit bereits innerhalb von 6 Stunden etwa 66 % ihrer Fluoreszenz verloren haben. Der Photofrin II - Gehalt der Zellen nimmt somit in den ersten 6 Stun-

den auf ca. 33 % ab. Im weiteren Verlauf geben die Zellen nur noch wenig Photofrin II ab und enthalten nach 3 Tagen noch knapp 20 % des Ausgangswertes. Auffallend hoch erscheint die relative Fluoreszenzintensität nach 24 Stunden Photofrin II - Abgabezeit bei geringer Standardabweichung im Vergleich zum entsprechenden Wert nach 6 Stunden Abgabezeit.

8.1.2.2 UNTERSUCHUNG DER PHOTOFRIN II - KOMPONENTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER PHOTOFRIN II - ABGABEZEIT

Diese Untersuchungen wurden analog zu den im Kapitel 8.1.1.4 beschriebenen durchgeführt.

*Tabelle 05 : Intensitätsverhältnis I der schnell ausbleichen-
den Photofrin II - Komponente zur langsam aus-
bleichenden Komponente in Abhängigkeit von der
Abgabezeit*

Photofrin II Abgabezeit	Anzahl der Zellen	I	Standard - abweichung
0 h	10	0,540	0,267
3 h	8	0,723	0,318
6 h	10	0,521	0,224
24 h	10	0,638	0,402
48 h	8	0,844	0,434
72 h	4	0,867	0,463

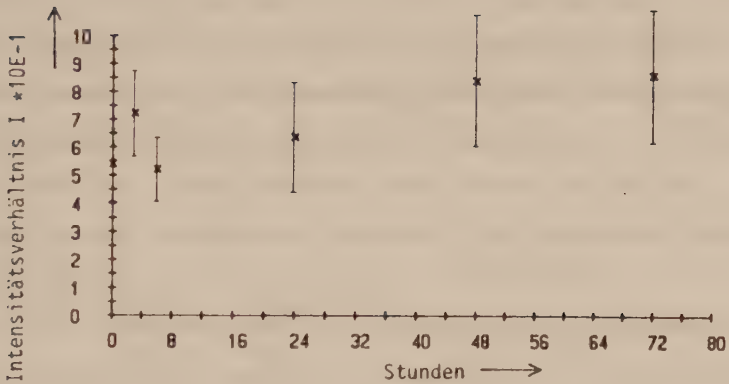


Abb. 20 : Abhängigkeit des Intensitätsverhältnisses I (wie im Abschnitt 8.1.1.4 definiert) von der Ph II-Ausschleuszeit bei Brown-Pearce-Tumorzellen

Ändert sich das Verhältnis der schnell ausbleichenden Komponente zu der langsam ausbleichenden Komponente in Abhängigkeit von der Photofrin II - Abgabezeit einer zuvor für 24 Stunden mit Photofrin II - haltigem Medium versetzten Zelle ? Auch bei diesen Berechnungen wurden die Zell - Autofluoreszenz und Streulicht abgezogen und dann aus den Integralen der beiden Komponenten der in Abschnitt 8.1.1.4 definierte Quotient " I " gebildet (Tabelle 05).

Untersucht man exemplarisch die relativ großen Differenzen des Quotienten I von 48 Stunden Photofrin II - Abgabezeit mit dem Quotienten der Abgabezeiten 0 Stunden und 6 Stunden

mittels t - Test für unverbundene Stichproben, so ergeben sich T - Werte von 1,831 (0 h / 48 h) und 2,047 (6 h / 48 h). Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 % besteht dementsprechend ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen beiden I-Quotienten. Betrachtet man alle I-Quotienten in der Abb.20, so scheint ein Trend zu einer leichten Zunahme dieser Quotienten bei längeren Ausschleuszeiten zu bestehen, d.h. der intrazelluläre Anteil der schnell ausbleichenden Photofrin II - Komponente nimmt im Verhältnis zur langsam ausbleichenden Komponente mit der Dauer der Inkubationszeit langsam zu.

8.2 NCI - H 358 UND A 549 - ZELLEN

Die Zellgröße beider Zelllinien, bzw. die durch das Mikroskop betrachtete Zellfläche, läßt sich auf Grund ihrer häufig länglichen Form nicht wie bei den Brown - Pearce - Zellen mit einem Durchmesser beschreiben. Vermißt man einen langen und einen kurzen Durchmesser, die rechtwinklig aufeinander stehen, gelingt eine bessere Betrachtung der Zellgröße. Für die Zelllinie NCI - H 358 wurden vorzugsweise Zellen mit einer Größe von etwa 25 μm x 40 μm und für die A 549 Zellen mit der Größe 30 μm x 45 μm zur Fluoreszenzmessung ausgewählt. Die Generationszeit bei den A 549-Zellen beträgt unter Anzuchtbedingungen (vergl.6.2) etwa 24 Stunden. Die NCI-H 358 - Zellen haben mit ca. 48 Stunden die doppelte Generationszeit.

8.2.1 PHOTOFRIN II - AUFNAHME IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT

Zu beiden Zelllinien wurde eine Meßserie durchgeführt, die eine Darstellung der Photofrin II - Aufnahme dieser Zellen in Abhängigkeit von der Zeit ermöglichte. Die Tabellen 06 und 07 zeigen die Zusammenstellung dieser Ergebnisse:

Tabelle 06 : NCI - H 358 - Zellen
Aufnahme von Photofrin II in Abhängigkeit
von der Photofrin II - Einwirkzeit

Einwirkzeit	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der relativen Photofrin II - Fluoreszenzintensität	Standardabweichung in %
0 min	54	0	5
10 min	60	450	23
1 h	54	516	27
3 h	66	483	26
6 h	68	772	17
9 h	70	1246	24
16 h	64	2381	31
24 h	62	2050	24
48 h	56	3217	31
72 h	58	3281	41
96 h	51	3499	37

In den Tabellen 06 und 07 erscheinen als Standardabweichung die Werte 5 % bzw. 14 % bei einer Photofrin - Einwirkzeit von 0 Minuten. Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß in der Spalte der Mittelwerte der relativen Photofrin II - Fluoreszenzintensität bereits die unvermeidbar mitgemessene Unter-

Tabelle 07 : A 549 - Zellen
Aufnahme von Photofrin II in Abhängigkeit
von der Photofrin II - Einwirkzeit

Einwirkzeit	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der relativen Photofrin II - Fluoreszenzintensität	Standardabweichung in %
0 min	21	0	14
10 min	126	661	21
1 h	151	869	20
3 h	149	1041	17
6 h	157	1318	20
9 h	134	1429	26
16 h	132	2278	28
24 h	161	2165	29
48 h	178	2678	30
72 h	163	2854	17
96 h	131	2656	19

grundlichtintensität in Höhe von 559 (Standardabweichung 5 %) bei den NCI - H 358 - Zellen und in Höhe von 449 (Standardabweichung 14 %) bei den A 549 - Zellen abgezogen worden sind, so daß die Meßwerte für 0 Minuten Einwirkzeit in den Tabellen mit dem Wert 0 erscheinen (vergleiche 6.6 und 8.1.1.1).

Von den NCI - H 358 - Zellen sind für die einzelnen Photofrin II - Einwirkzeiten jeweils zwischen 54 und 70 Einzelzellen vermessen worden (Tabelle 06). Die Mittelwerte der relativen Photofrin II - Fluoreszenzintensitäten nehmen weitgehend parallel zur Einwirkzeit zu, wobei der Mittelwert für 24 Stunden Einwirkzeit, 2050, sehr niedrig erscheint bei außerdem vergleichsweise geringer Standardabweichung von 24 %.

Global betrachtet liegen die Standardabweichungen bei den NCI - H358 - Zellen etwas höher als bei den in *Tabelle 07* zusammengestellten entsprechenden Ergebnissen der Zelllinie A 549. Die Standardabweichungen für die Einwirkzeiten 72 und 96 Stunden sind bei den A 549 Zellen betont niedrig, so daß die höheren Standardabweichungen der NCI - H 358 Zellen für diese beiden Photofrin II - Einwirkzeiten besonders hoch erscheinen. Eine Auswertung mittels t-Test für unverbundene Stichproben ist in diesem Fall, wie unter Abschnitt 6.7 beschrieben, nicht sinnvoll und soll deshalb unterbleiben.

Für die Einwirkzeit 48 h mit nahezu gleicher Standardabweichung ist die T - Wert - Bestimmung sinnvoll. Der T - Wert beträgt 4,173. Aus der in der Literatur (99) bekannten *Tabelle "Kritische Werte der t-Verteilung"* (vergleiche 6.7) läßt sich für den Freiheitsgrad 230 ($= 176 + 56 - 2$) ablesen, daß ein signifikanter Unterschied zwischen der Photofrin II - Fluoreszenzintensität der NCI - H 358 - Zellen und A 549-Zellen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 0,1 % besteht. Aus der *Abbildung 21* läßt sich die allgemeine Tendenz erkennen, daß die NCI - H 358 Zellen auch für die Einwirkzeiten 72 und 96 Stunden mehr Photofrin II akkumulieren als die A - 549 Zellen.

Da die NCI - H 358 - Zellen durchschnittlich kleiner sind als die A 549 - Zellen, wäre dieser ohnehin deutliche Unterschied bezogen auf das Zellvolumen wahrscheinlich noch größer.

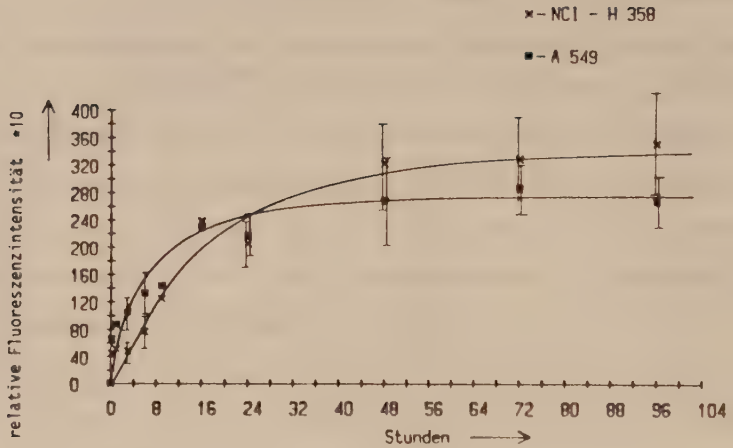


Abb.21 : Darstellung des Photofrin II - Gehaltes in Abhängigkeit von der Einwirkzeit für NCI-H 358 und A 549 - Zellen

8.2.2 PHOTOFRIN II - ABGABE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT

8.2.2.1 NCI - H 358 - ZELLEN

Tabelle 08 enthält die Zusammenstellung der Meßergebnisse zur Abgabe von Photofrin II nach einer 24-stündigen Einwirkzeit dieser Substanz. In Klammern stehen die Ergebnisse der Zellen mit Mediumwechsel.

Tabelle 08 : NCI-H 358 - Zellen

Photofrin II-Abgabe in Abhängigkeit von der Zeit nach einer 24-stündigen Einwirkzeit.

Abgabezeit	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der relativen Photofrin II-Fluoreszenzintensität	Standardabweichung in %	T-Wert / Irrtums - wahrscheinlichkeit
0 h	24	2572	21	
1 h	35	2055	33	
3 h	38	1834	25	
6 h	15	1786	36	0,916/
	(13)	(1579)	(34)	0,35
9 h	14	1770	34	0,546
	(15)	(1671)	(21)	
16 h	22	1323	24	0,419
	(23)	(1367)	(28)	
24 h	20	1251	15	2,792/
	(22)	(1014)	(33)	0,01
48 h	22	858	38	5,382/
	(20)	(453)	(19)	0,0001
72 h	22	531	16	9,625/
	(24)	(338)	(14)	0,0001
96 h	19	401	21	3,488/
	(22)	(300)	(33)	0,002
Zellen o.Ph II	11	0	2	

In Klammern stehen die Meßwerte der Zellen mit Mediumwechsel.

In der ganz rechten Spalte der Tabellen 08 und 09 wurde neben dem " T - Wert " auch die Wahrscheinlichkeit angegeben, daß kein Unterschied im Photofrin II - Abgabeverhalten zwischen den Zellen mit Mediumwechsel im Vergleich zu Zellen ohne Mediumwechsel besteht. Die obere Zahl gibt den T - Wert des t - Testes für unverbundene Stichproben an ; die untere Zahl gibt die aus einer Tabelle zum t - Test auffindbare Irrtumswahrscheinlichkeit der Annahme an, daß ein Unterschied zwi-

schen den Zellen mit Mediumwechsel gegenüber denen ohne Mediumwechsel besteht. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten mußten zum Teil interpoliert werden. Sind die beiden verglichenen Mittelwerte eher gleich als unterschiedlich (Irrtumswahrscheinlichkeit über 0,5), wird die Irrtumswahrscheinlichkeit nicht angegeben.

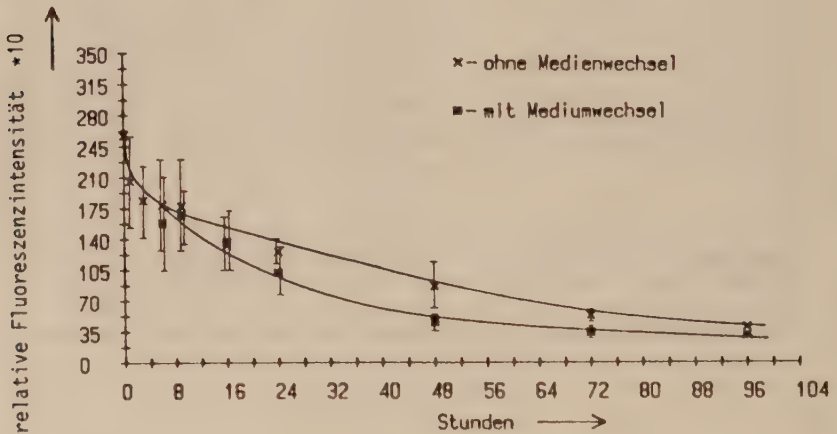


Abb. 22 : Abgabe von Photofrin II in Abhängigkeit von der Zeit bei NCI - H 358 - Zellen, nachdem diese Zellen zuvor für 24 Stunden einem Photofrin II - haltigen Medium ausgesetzt waren.

Analog zu Tabelle 08 sind in Tabelle 09 die Ergebnisse der Abgabe von Photofrin II nach einer hier 48-stündigen Einwirkzeit zusammengefaßt. In Klammern stehen die Meßergebnisse der Zellen mit Mediumwechsel.

Tabelle 09 : NCI-H 358 - Zellen

*Photofrin II-Abgabe in Abhängigkeit von der Zeit
nach einer 48-stündigen Einwirkzeit.*

Abgabe- zeit	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der relativen Photo- frin II-Fluores- zenzintensität	Standard- abweichung in %	T-Wert / Irrtums - wahrschein- lichkeit
0 h	35	3217	38	
1 h	53	2717	40	
3 h	47	2040	31	
6 h	30	2133	43	2,018/
	(33)	(1737)	(36)	0,05
9 h	32	1812	45	1,640/
	(19)	(1459)	(41)	0,30
16 h	37	1224	31	1,041/
	(30)	(1075)	(40)	0,35
24 h	32	952	28	0,537
	(37)	(1000)	(44)	
48 h	34	972	57	3,103/
	(45)	(689)	(33)	0,005
72 h	33	842	34	3,919/
	(38)	(618)	(31)	0,001
96 h	44	553	27	3,001/
	(40)	(443)	(42)	0,008
Zellen o. PhII	54	0	8	

In Klammern stehen die Meßwerte der Zellen mit Mediumwechsel.

Aus den Abbildungen 22 und 23 wird deutlich, daß ein Unterschied im Photofrin II - Abgabeverhalten zwischen Zellen mit Mediumwechsel im Vergleich zu Zellen ohne Mediumwechsel besteht. Nach den T - Berechnungen (siehe Tabellen 08 und 09) kann ein hinreichend signifikanter Unterschied (Signifikanzniveau $\alpha = 0,01$) jedoch erst nach etwa 24 Stunden Abgabezeit angenommen werden.

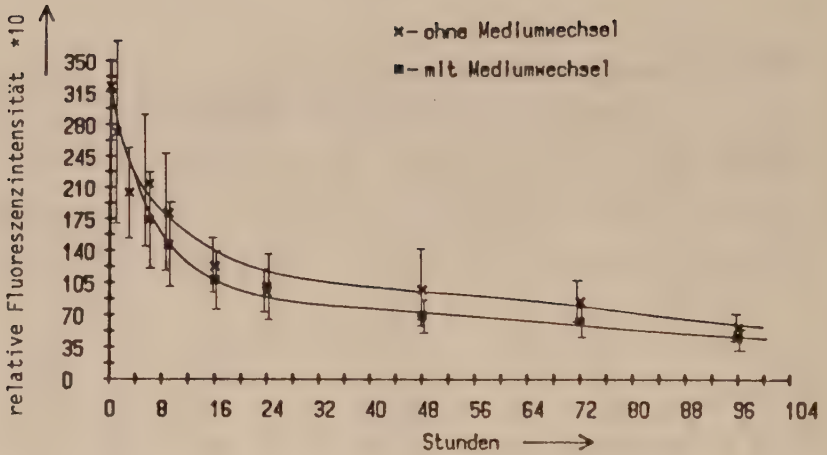


Abb. 23 : Abgabe von Photofrin II in Abhängigkeit von der Zeit bei NCI-H 358 - Zellen, nachdem diese Zellen zuvor für 48 Stunden einem Photofrin II - haltigen Medium ausgesetzt waren.

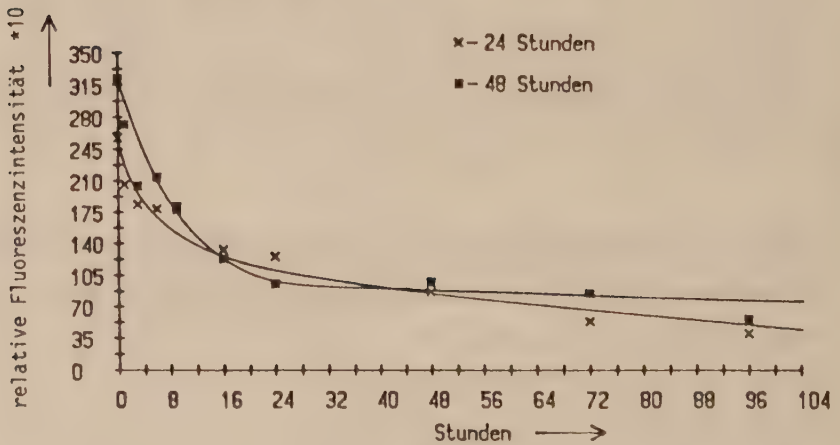


Abb. 24 : Vergleich der relativen Photofrin II - Fluoreszenzintensität der Zellen ohne Mediumwechsel (24 h bzw. 48h) in Abhängigkeit von der Photofrin II - Abgabezeit.

Der in *Abbildung 24* aufgezeichnete Vergleich zwischen Zellen, die für 24 Stunden mit Photofrin II inkubiert wurden und Zellen, denen diese Substanz für 48 Stunden angeboten wurde, läßt einen Unterschied im Photofrin II - Abgabeverhalten erkennen. Die Vermutung, daß die länger inkubierten Zellen auch höhere Photofrin II - Konzentrationen aufweisen, läßt sich aus der *Abbildung 24* und zusätzlichen Untersuchungen mittels t-Test für unverbundene Stichproben nur für die erste Stunde und für den Zeitraum 72. bis 96. Stunde Abgabezeit bestätigen. Nach 24 Stunden Ausschleuszeit liegt der Mittelwert der relativen Photofrin II - Fluoreszenzintensität der Zellen mit der langen Photofrin II - Einwirkzeit sogar signifikant (Signifikanzniveau $\alpha = 0,0001$) über den Zellen mit einer Photofrin II - Einwirkzeit von 24 Stunden . Auf Grund der allgemeinen aus der *Abbildung 24* klar ersichtlichen Tendenz, daß die relative Photofrin II - Fluoreszenzintensität der länger inkubierten Zellen (48) auch während der Ausschleusphase höher bleibt als bei kürzer inkubierten Zellen (24 h), sollte dieses graphische Bild durch die Aussage statistischer Methoden nicht als ganzes in Frage gestellt werden. Offenbar gleichen sich die Photofrin II - Fluoreszenzintensitäten beider Stichproben (24 h/48 h) in dem Zeitraum zwischen 10 und 40 Stunden Abgabezeit, wie auch aus *Abbildung 24* zu entnehmen ist, vorübergehend an. Für den übrigen Zeitraum verbleibt die knapp 20 % Differenz des Wertes für 48

Stunden gegenüber 24 Stunden Inkubationszeit auch während der Ausschleusphase bestehen.

8.2.2.2 A 549 - ZELLEN

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Photofrin II - Abgabeverhalten der A 549-Zellen sind in *Tabelle 10* und *11* zusammengestellt.

Tabelle 10 : A 549 - Zellen

Photofrin II-Abgabe in Abhängigkeit von der Zeit nach einer 24-stündigen Einwirkzeit.

Abgabezeit	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der relativen Photofrin II-Fluoreszenzintensität	Standardabweichung in %	T-Wert / Irrtums - wahrscheinlichkeit
0 h	43	2165	24	
1 h	53	1484	15	
3 h	28	1453	19	
6 h	32 (30)	1121 (1388)	17 (19)	4,591/ 0,0001
9 h	30 (27)	1260 (1309)	20 (26)	0,621
16 h	23 (26)	993 (766)	22 (13)	4,772/ 0,0001
24 h	27 (23)	715 (601)	19 (15)	3,430/ 0,002
48 h	22 (25)	406 (339)	19 (19)	3,245/ 0,005
72 h	25 (24)	314 (275)	21 (42)	1,459/ 0,2
96 h	21 (25)	321 (137)	18 (26)	13,224/ 0,0001
Zellen o. PhII	24	0	3	

In Klammern stehen die Meßwerte der Zellen mit Mediumwechsel.

Tabelle 11 : A 549 - Zellen

Photofrin II-Abgabe in Abhängigkeit von der Zeit nach einer 48-stündigen Einwirkzeit.

Abgabezeit	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der relativen Photofrin II-Fluoreszenzintensität	Standardabweichung in %	T-Wert / Irrtumswahrscheinlichkeit
0 h	112	2678	27	0,391
1 h	51	1831	23	
3 h	107	1600	16	
6 h	88 (63)	1435 (1453)	18 (21)	
9 h	-- (--)	-- (--)	-- (--)	0,221
16 h	53 (57)	1207 (1196)	25 (18)	
24 h	83 (81)	1018 (840)	18 (16)	7,079/ 0,0001
48 h	74 (58)	502 (474)	26 (27)	1,234/ 0,25
72 h	72 (76)	461 (509)	24 (28)	2,279/ 0,05
96 h	55 (51)	517 (344)	16 (31)	9,370/ 0,0001
Zellen o. PhII	21	0	8	

In Klammern stehen die Meßwerte der Zellen mit Mediumwechsel.

Erläuterungen zur Spalte T-Wert / Irrtumswahrscheinlichkeit sind in Abschnitt 8.2.2.1 bezüglich *Tabelle 08* und *09* aufgeführt und gelten analog für *Tabelle 10* und *11*. Während in *Tabelle 11* die Stichprobenumfänge im wesentlichen zwischen 50 bis 80 Einzelzellen liegen, wurden nach 24-stündiger Photofrin II - Einwirkzeit (*Tabelle 10*) nur jeweils 20 bis 30 Einzelzellen vermessen. Ein Vergleich der Meßergebnisse zwischen

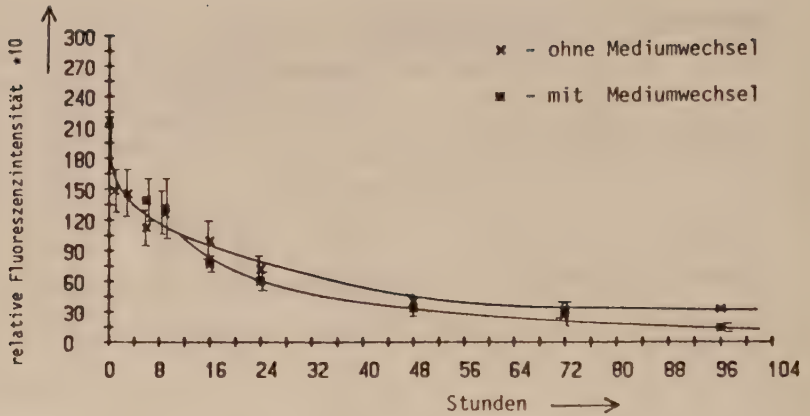


Abb. 25 : Relative Photofrin II - Fluoreszenzintensität von A 549 - Zellen in Abhängigkeit von der Abgabezeit, nachdem diese Zellen zuvor für 24 Stunden einem Photofrin II - haltigen Medium ausgesetzt waren. (Tabelle 10)

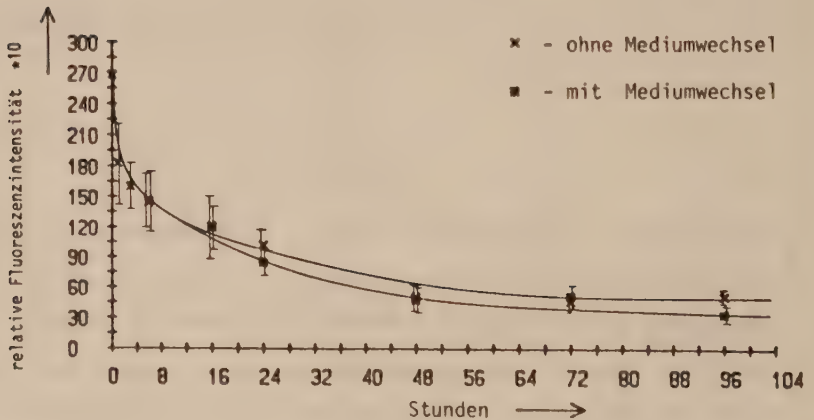


Abb. 26 : Abgabe von Photofrin II in Abhängigkeit von der Zeit bei A 549 - Zellen, nachdem diese Zellen zuvor für 48 Stunden einem Photofrin II - haltigen Medium ausgesetzt waren.

24- und 48-stündiger Photofrin II - Einwirkzeit mittels t-Test für unverbundene Stichproben ist aber dennoch sinnvoll, da die Standardabweichungen auf gleichem Niveau liegen (vergleiche 6.7).

Wie bei den NCI-H 358 - Zellen enthalten die A 549 - Zellen in Abb.25 (24 h Inkubationszeit), die Mediumwechsel erfahren haben, nach 24 Stunden im allgemeinen weniger Photofrin II als die Zellen, die nur einmal am Anfang der Meßreihe Photofrin II - freies Medium erhalten haben. Diese Differenz fällt bei den A 549 - Zellen jedoch wesentlich moderater aus. Die Meßwerte und die dazu gehörenden T-Werte zeigen für den Zeitpunkt 72 Stunden nach dem Stopp der 48-stündigen Photofrin II - Einwirkzeit (Abb.26 bzw. Tabelle 11) sogar entgegengesetzte Werte, d.h. der Meßwert mit Mediumwechsel ist höher als der ohne Wechsel. Generell läßt sich aber feststellen, daß die Meßwerte für Zellen mit Mediumwechsel nach etwa 24 h Photofrin II- Abgabezeit - wie aus den Abgabekurven ersichtlich - etwa 10 - 25 % unter den Meßwerten für Zellen ohne Mediumwechsel liegen.

Vergleicht man das Ausschleusverhalten von A 549 - Zellen, die zuvor für 24 Stunden dem Photofrin II ausgesetzt waren, mit Zellen, die für 48 Stunden mit Photofrin II inkubiert wurden (siehe nachfolgende Abbildung 27), zeigt sich, daß die anfängliche Differenz der Fluoreszenzintensität über den Zeitraum der gesamten Meßserie bestehen bleibt.

Durch die Berechnung der T - Werte und die Bestimmung der Irrtumswahrscheinlichkeit, die für alle Meßzeiten unter 1% liegt, läßt sich dieses Ergebnis absichern. Der Photofrin II - Gehalt der A 549 - Zellen mit der längeren Photofrin II - Einwirkzeit ist im Durchschnitt etwa 20 % über dem Photofrin II - Gehalt der 24 - stündigen Einwirkzeit. Für die NCI-H 358 -Zellen gilt prinzipiell das gleiche. Die Differenz im Photofrin II - Gehalt erschien bei diesen Zellen allerdings weniger ausgeprägt.

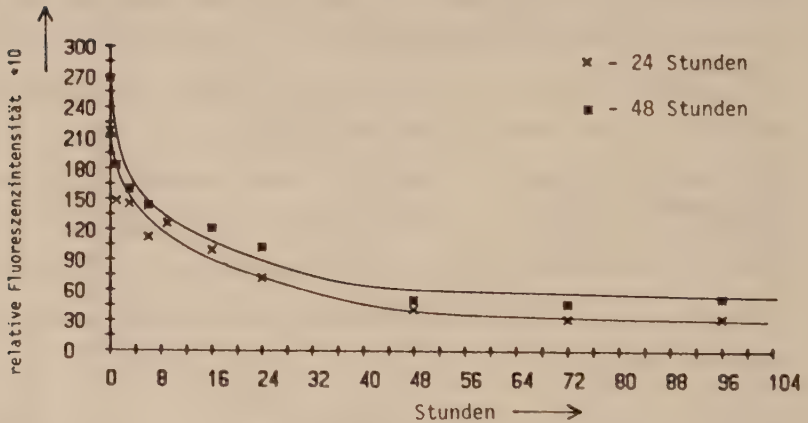


Abb. 27 : Aus den beiden vorangehenden Abbildungen sind noch einmal zum direkten Vergleich die Photofrin II - Abgabekurven der Zellen ohne Mediumwechsel aufgezichnet.

8.3 OS 24 UND M 24 - ZELLEN

Die OS 24 - Zellen sind Osteosarkomzellen und die Zelllinie M 24 entstammt aus Muskelzellen derselben NMRI Maus. Beide Zelllinien wachsen unter Anzuchtbedingungen (vergleiche 6.2) mit einer Generationszeit von ca. 24 Stunden. Die Pharmakokinetik von Photofrin II wurde an diesen beiden Zelllinien im Vergleich von Tumorzellen zu Normalzellen betrachtet. Die Größe der Zellen (vergleiche 8.2) war mit durchschnittlich 51 μm x 18 μm bei den M 24 - Zellen und 42 μm x 20 μm bei den OS 24 - Zellen in etwa gleich.

8.3.1 PHARMAKOKINETIK DES PHOTOFRIN II

Zur Untersuchung der Pharmakokinetik des Photofrin II wurde die Aufnahme von Photofrin II in Abhängigkeit von der Photofrin II - Einwirkzeit für OS 24 - Zellen (Tabelle 12) und für M 24 - Zellen (Tabelle 13) gemessen. In den Tabellen 14 und 15 sind analog dazu die Ergebnisse der Messungen der Abgabe von Photofrin II nach einer 24-stündigen Einwirkzeit zusammengefaßt.

Tabelle 12 : OS 24 - Tumorzelle

Aufnahme von Ph II in Abhängigkeit von der Zeit

Einwirkzeit	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der relativen Photofrin II - Fluoreszenzintensität	Standardabweichung in %
0 min	21	0	6
10 min	36	3120	18
1 h	42	4672	13
3 h	42	5833	14
5 h	46	7371	12
7 h	45	9439	16
10 h	45	10458	15
14 h	47	11882	22
18 h	37	12131	18
24 h	42	14070	17
30 h	41	13215	16
48 h	29	16477	18
72 h	27	16066	22
96 h	24	19040	33

Tabelle 13 : M 24 - Normalzelle

Aufnahme von Ph II in Abhängigkeit von der Zeit

Einwirkzeit	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der relativen Photofrin II - Fluoreszenzintensität	Standardabweichung in %
0 min	11	0	1
10 min	43	2471	16
1 h	39	4195	22
3 h	39	6170	15
5 h	41	6839	17
7 h	41	9337	19
10 h	47	8472	18
14 h	47	10625	24
18 h	34	12470	22
24 h	41	11246	20
30 h	35	16623	24
48 h	69	14784	18
72 h	41	13985	19
96 h	49	15475	21

Tabelle 14 : OS 24 - Tumorzellen

Photofrin II-Abgabe in Abhängigkeit von der Zeit nach einer 24-stündigen Einwirkzeit.

Abgabezeit	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der relativen Photofrin II - Fluoreszenzintensität	Standardabweichung in %
0 h	30	14070	24
1 h	38	8076	27
3 h	35	8148	25
5 h	28	6501	38
7 h	36	5708	23
10 h	26	5208	23
14 h	33	5432	25
18 h	38	5347	22
24 h	29	5467	26
30 h	37	4579	32
48 h	33	3056	36
72 h	34	2811	25
96 h	31	3068	36
Zellen o. Ph II	18	0	3

Tabelle 15 : M 24 - Normalzellen

Photofrin II-Abgabe in Abhängigkeit von der Zeit nach einer 24-stündigen Einwirkzeit.

Abgabezeit	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der relativen Photofrin II - Fluoreszenzintensität	Standardabweichung in %
0 h	43	11246	26
1 h	39	7872	27
3 h	40	8322	18
5 h	39	7085	22
7 h	51	6697	27
10 h	41	5013	22
14 h	41	5159	25
18 h	48	3720	22
24 h	44	3024	23
30 h	34	2961	27
48 h	69	1876	26
72 h	65	1599	28
96 h	41	1317	28
Zellen o. Ph II	19	0	2

Wie aus den Tabellen 12 bis 15 zu entnehmen ist, wurden pro Meßpunkt durchschnittlich 40 Zellen vermessen. Die Standardabweichungen der jeweils vermessenen Photofrin II - Fluoreszenzintensitäten lagen in der Regel zwischen 20 und 25 %.

Wie in der Abbildung 28 aufgezeigt, ist die Pharmakokinetik des Photofrin II in beiden Zelllinien sehr ähnlich.

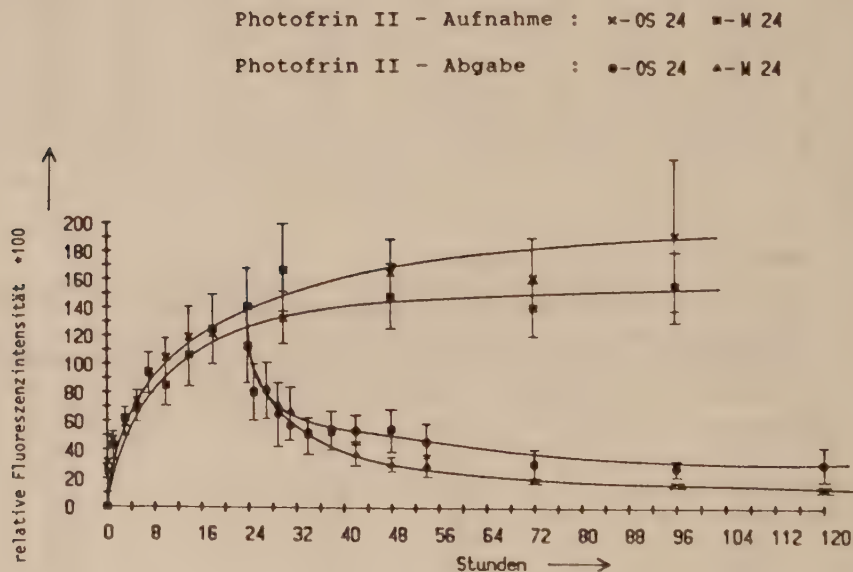


Abb. 28 : Pharmakokinetik des Photofrin II. Der relative Photofrin II - Gehalt von NMRI Mäusezellen ist dargestellt in Abhängigkeit von der Zeit. Bei einem Teil der Zellen wurde nach 24 Stunden das Photofrin II - haltige Medium gegen Photofrin II - freies Medium ausgetauscht (Photofrin II - Abgabe).

Jeweils zum Ende der Aufnahme-Kurven wurden erwartungsgemäß die höchsten Fluoreszenzintensitätswerte gemessen, wenn man von dem aus dem Kurvenverlauf stark herausfallenden Wert für M 24 - Zellen bei 30 Stunden einmal absieht. Betrachtet man die Photofrin II - Aufnahme - Kurve für M 24 - Zellen nur im Zeitintervall von 30 - 96 Stunden, läßt sich für diesen Zeitraum keine Änderung der Photofrin II - Fluoreszenz feststellen. Dies steht im Gegensatz zur Tumorzelle, die im gleichen Zeitintervall weiterhin Photofrin II akkumuliert. Gegen Ende der Aufnahmekurven wird erkennbar, daß die Tumorzellen OS 24 mehr Photofrin II speichern als die Normalzellen M 24.

Diese Differenz im Aufnahmeverhalten von Photofrin II nach etwa 48 Stunden bis zum Ende der Meßreihe läßt sich mittels t - Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % angeben. Die OS 24 Tumorzellen nahmen somit gegen Ende der Meßreihe etwa 10 % mehr Photofrin II auf als die Muskelzellen M 24.

Die Kurven zum Ausschleusverhalten von Photofrin II streben nach etwa 42 Stunden deutlich auseinander. Die OS 24 - Zellen speicherten nach der entsprechenden Abgabezeit von 18 Stunden etwa 50 % mehr Photofrin II als die M 24 - Zellen. Diese Differenz nimmt bis zum Ende der Meßserien nach 96 Stunden Photofrin II - Abgabezeit auf 100 % zu. Mittels t - Test für unverbundene Stichproben läßt sich die Differenz bezüglich der Photofrin II - Abgabekurven auf einem hohen Signifikanzniveau ($\alpha = 0,001$) bestätigen.

8.3.2 EINFLUß DER ZELLAGE ZUM ZELLVERBAND

Es wurde die Einflußnahme der Zellage zum Zellverband bezüglich des Photofrin II - Abgabeverhaltens nach einer 24-stündigen Einwirkzeit untersucht.

Tabelle 16 : OS 24 - Tumorzellen
Ph II-Abgabe in Abhängigkeit von der Zellage

Abgabezeit Gruppe	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der relativen Photo- frin II-Fluores- zenzintensität	Standard- abweichung in %	T-Wert / Irrtums - wahrschein- lichkeit
0 h				
dicht	22	16548	20	2,085/
dünn	19	19686	31	0,05
5 h				
dicht	21	9111	17	2,821/
dünn	16	12326	40	0,01
24 h				
dicht	22	5852	27	0,857/
dünn	20	6369	36	0,50

Tabelle 17 : M 24 - Normalzellen
Ph II-Abgabe in Abhängigkeit von der Zellage

Abgabezeit Gruppe	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der relativen Photo- frin II-Fluores- zenzintensität	Standard- abweichung in %	T-Wert / Irrtums - wahrschein- lichkeit
0 h				
dicht	20	11098	22	5,797/
dünn	20	15991	18	0,0001
5 h				
dicht	17	8295	23	0,884/
dünn	20	8969	29	0,50
24 h				
dicht	18	4266	19	0,994/
dünn	18	4644	30	0,50

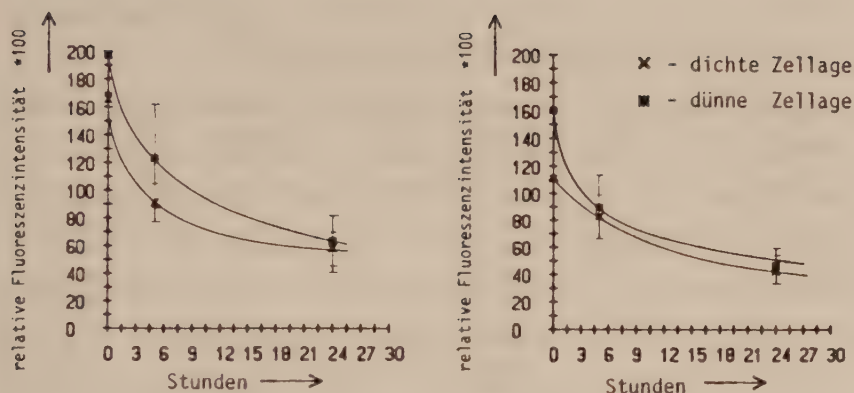


Abb. 29 : Relative Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit: links von OS 24 - Zellen
rechts von M 24 - Zellen
Nach einer 24 - stündigen Photofrin II - Einwirkzeit erhielten die Zellen (zum Zeitpunkt $t = 0$) Photofrin II - freies Medium.

Aus der graphischen Darstellung der Ergebnisse (Abb. 29) läßt sich bei den OS 24 - Tumorzellen eine Abhängigkeit der Zelllage auf das Photofrin II - Speicherungsverhalten erkennen. Bei den M 24 - Normalzellen zeigt sich nur eine Differenz in der Photofrin II - Fluoreszenzintensität für den Zeitpunkt 0 Stunden, also nach 24-stündiger Einwirkzeit ohne nachfolgender Abgabephase. Im weiteren Verlauf der Meßserie kommt es bei beiden Zelllinien zum Angleichen der Fluoreszenzintensität der Zellen am Zellverband und der Zellen, die völlig isoliert liegen. Aus den Kurvenverläufen ist bei beiden Zelllinien eine höhere Photofrin II - Fluoreszenzintensität der isoliert lie-

genden Zellen zum Zeitpunkt 0 Stunden ersichtlich; dies gilt ebenso für 5 Stunden Ausscheuszeit bei den OS 24 - Zellen. Der t - Test für unverbundene Stichproben bestätigt diesen Sachverhalt auf dem Signifikanzniveau 0,05. Augenscheinlich besteht ein gewisser Einfluß der Zellage zum Zellverband bezüglich des Photofrin II - Speicherverhaltens. Die primär höhere Photofrin II - Akkumulation von isolierten Zellen führt über eine schnellere Abgabe dieser Substanz innerhalb von 24 Stunden zu einem Angleichen der Fluoreszenzintensitäten der isolierten Zellen an die der Zellen im Zellverband.

8.4 ROS 17/2.8 UND ROS 25/1 ZELLEN

Beide Zelllinien entstammen einem Osteosarkom derselben ACI Ratte und wachsen unter Anzuchtbedingungen (vergl. 6.2) mit einer Generationszeit von etwa 18 Stunden. Die ROS 17/2.8 Zellen sind die Osteosarkomzellen, während die ROS 25/1 Zellen nicht osteogene Fibroblasten sind. Die durchschnittliche Zellgröße bzw. Zellfläche beider Zelllinien differierte im mikroskopischen Bild so stark, daß auch die gezielt ausgesuchten und vermessenen ROS 17/2.8 Zellen (mittlere Größe 58 μm x 23 μm) immer noch durchschnittlich 25 % größer waren als die ROS 25/1 Zellen mit einer mittleren Größe von 48 μm x 22 μm (vergl. 8.2). Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Pharmakokinetik der ROS 17/2.8 - Osteosarkomzellen und ROS 25/1 - Fibroblasten sind in den Tabellen 18 bis 21 zusammengestellt:

Tabelle 18 : ROS 17/2.8 - Zellen
Aufnahme von Photofrin II in Abhängigkeit von
der Photofrin II - Einwirkzeit

Einwirkzeit	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der relativen Photofrin II - Fluoreszenzintensität	Standardabweichung in %
0 min	29	0	7
15 min	28	1070	23
1 h	15	3012	25
3 h	21	5948	27
6 h	21	6588	29
9 h	23	7834	37
16 h	30	10531	33
24 h	61	11486	39
48 h	29	14077	30
72 h	32	13137	32
96 h	20	13887	38

Tabelle 19 : ROS 25/1 - Zellen
Aufnahme von Photofrin II in Abhängigkeit von
der Photofrin II - Einwirkzeit

Einwirkzeit	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der relativen Photofrin II - Fluoreszenzintensität	Standardabweichung in %
0 min	30	0	12
15 min	32	689	17
1 h	31	1410	17
3 h	32	1602	22
6 h	29	2083	17
9 h	30	3102	19
16 h	28	5462	29
24 h	59	5671	27
48 h	37	7797	18
72 h	35	7057	18
96 h	28	6500	17

Tabelle 20 : ROS 17/2.8 - Zellen

*Photofrin II-Abgabe in Abhängigkeit von der Zeit
nach einer Einwirkzeit von 24 Stunden*

Abgabezeit	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der rela- tiven Photofrin II - Fluoreszenzintensität	Standardab- weichung in %
0 h	61	11486	39
1 h	29	9078	40
3 h	24	8660	27
6 h	33	7256	46
9 h	33	6627	32
16 h	31	5322	53
24 h	65	6589	45
48 h	26	3294	60
72 h	26	2250	47
96 h	33	1600	59

Tabelle 21 : ROS 25/1 - Zellen

*Photofrin II-Abgabe in Abhängigkeit von der Zeit
nach einer Einwirkzeit von 24 Stunden*

Abgabezeit	Anzahl der gemessenen Zellen	Mittelwert der rela- tiven Photofrin II - Fluoreszenzintensität	Standardab- weichung in %
0 h	59	5671	27
1 h	29	3505	22
3 h	29	3456	24
6 h	34	3184	29
9 h	32	2840	25
16 h	31	2372	24
24 h	70	1856	22
48 h	36	1195	16
72 h	36	1031	22
96 h	33	1282	15

Pro Meßpunkt sind, wie den voranstehenden 4 Tabellen zu entnehmen ist, zwischen 15 und 70 einzelne Zellen (im allgemeinen $30 \div 35$) vermessen worden.

In den Tabellen 18 und 19 ist erkennbar, daß es jeweils zu einer stetigen Zunahme der Photofrin II - Fluoreszenzintensität mit ebenfalls zunehmender Einwirkzeit dieses Pharmakons bis zum Wert für 48 Stunden kommt, der jeweils ein Maximum darstellt. Auf Grund der bisherigen Erfahrungen, der alternierenden Meßvorbereitung und des alternierenden Meßablaufs - nach den ROS 17/2.8 - Zellen wurden sofort die ROS 25/1 - Zellen vermessen - ist hier wahrscheinlich kein wirkliches Maximum der Photofrin II - Speicherung gegeben; das Ergebnis ist vielmehr im Sinne einer weitgehenden Konstanz der Photofrin II - Akkumulation im Zeitraum von 48 bis 96 Stunden zu betrachten. Daß dieser Wert für 48 Stunden bei beiden Zelllinien maximal ist, könnte auch in einer zufälligen gleichsinnigen Schwankung begründet sein.

Betrachtet man die Standardabweichungen beider Zelllinien miteinander, wird deutlich, daß die Meßwerte der ROS 17/2.8 - Tumorzellen wesentlich größere Schwankungen (Standardabweichung ca. 30 %) unterworfen sind als die Meßwerte bei den ROS 25/1 - Zellen (Standardabweichung etwa 20 %). In den Tabellen 20 und 21 wird der Unterschied der Schwankungsbreiten noch größer. Bei den ROS 17/2.8 - Zellen liegt die maximale Standardabweichung bei 60 % für den Meßwertdurchschnitt nach

48 Stunden Abgabezeit. Diese hohen Standardabweichungen bei den ROS 17/2.8 - Zellen lassen sich mit dem allgemein variationsreichen mikroskopischen Zellbild erklären, das sich trotz sorgfältiger Zellauswahl in der Standardabweichung deutlich zeigt.

Beim Vergleich der Werte in *Tabelle 20* mit denen der *Tabelle 21* fällt auf, daß die Tumorzellen auch noch im Zeitraum von 48 + 96 Stunden weiterhin eine erhebliche Abnahme der Photofrin II - Fluoreszenzintensität erfahren, während die ROS 25/1 - Zellen im gleichen Zeitraum keine nennenswerte Änderung der Fluoreszenz erkennen lassen.

In der nachfolgenden *Abbildung 30* ist die Pharmakokinetik des Photofrin II an ROS 17/2.8 und ROS 25/1 - Zellen graphisch dargestellt. Im Zeitraum 0 bis 24 Stunden sind die beiden Photofrin II - Aufnahme - Kurven gezeichnet, die auch über diesen Zeitraum hinaus weitergeführt sind. Zum Zeitpunkt 24 Stunden beginnen zusätzlich zwei Kurven, die entsprechend den *Tabellen 20* und *21* das Photofrin II - Abgabeverhalten nach vorangegangener 24-stündiger Inkubationszeit verbildlichen. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit.

Photofrin II - Aufnahme : × - ROS 17/2.8 ■ - ROS 25/1
Photofrin II - Abgabe : ● - ROS 17/2.8 ▲ - ROS 25/1

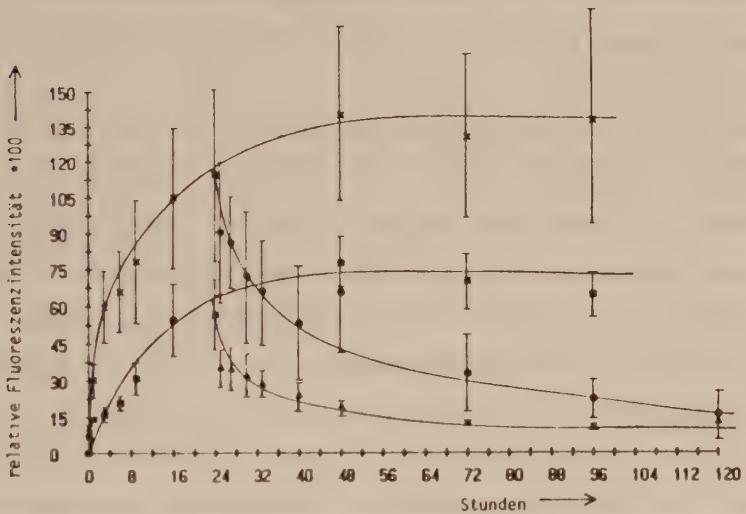


Abb. 30 : Pharmakokinetik des Photofrin II
Osteosarkomzellen ROS 17/2.8 und Fibroblasten
ROS 25/1

Die durchgeführte Versuchsreihe zeigt, daß die ROS 17/2.8 - Osteosarkomzellen zu fast allen Meßzeiten etwa doppelt so viel Photofrin II speichern wie die ROS 25/1 - Fibroblasten. Eine Ausnahme davon bildet der Zeitpunkt 120 Stunden. Die beiden Meßwerte der Ausschleuskurven liegen zu diesem Zeitpunkt in etwa gleich hoch. Die ROS 17/2.8 - Zellen waren, wie unter 7.4 erwähnt, ca. 25 % größer als die ROS 25/1 - Zellen. Nach Vorbereitung der Zellen für die Messung (vergleiche 6.2) kann davon ausgegangen werden, daß die vermessenen Zellen

unter dem Deckgläschen in etwa die gleiche Höhe hatten. Unter Berücksichtigung des Zellvolumens speichern die ROS 17/2.8 - Zellen immer noch rund 50 % mehr Photofrin II als die Fibroblasten.

Wenn man die Meßwerte der ROS 17/2.8 - Zellen um 25 % verringert, in der Annahme, daß Zellgröße und Photofrin II - Gehalt in etwa eine lineare Beziehung bilden, zeigen sich unter Anwendung des t - Testes für unverbundene Stichproben fast für die gesamten Kurvenverläufe hoch signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,001 \%$) zwischen den beiden Zelllinien. Nur für die Werte " Photofrin II - Aufnahme nach 15 min Einwirkzeit " und " Abgabe von Photofrin II nach 96 Stunden Abgabezeit " (entspricht der Versuchsdauer 120 Stunden in der Abbildung) fällt die Differenz erheblich weniger signifikant ($\alpha = 10 \%$) aus.

Im folgenden Abschnitt sind dazu noch intrazelluläre Beobachtungen photographisch dokumentiert und erläutert.

8.5 INTRAZELLULÄRE PHOTOFRIN II - VERTEILUNG, PHOTOGRAPHISCH DOKUMENTIERT

Jeder Fluoreszenzaufnahme von Zellen wird eine Durchlichtaufnahme derselben Zellen gegenübergestellt. Der Bildausschnitt wurde in diesem Fall nicht geändert, so daß man z.B. stark fluoreszierende Bezirke leicht auf der Durchlichtaufnahme auffinden kann (siehe Seite 121 ff).

8.5.1 OS 24 - ZELLEN

Vergleicht man die Abb.31 mit der Abb.33 , so läßt sich außer einigen Zellmembranveränderungen und einer etwas schärferen Kernabgrenzung der Zelle in Abb.33 durch die photodynamische Therapie kein wesentlicher Unterschied feststellen. Das Photofrin II bewirkt per se demnach keine sichtbare intrazelluläre Veränderung an OS 24 - Tumorzellen. Im Fluoreszenzbild Abb. 32 zeigt sich weitgehend eine diffuse, perinukleäre Photofrin II - Anreicherung unter weitgehender Aussparung des Zellkerns. Die scheinbar intranukleäre Fluoreszenz ist vermutlich auf die räumliche Überlagerung beim zweidimensionalen Mikroskopbild zurückzuführen (vergleiche Abb. 36, 38, 41).

8.5.2 M 24 - ZELLEN

Bei den M 24 - Normalzellen zeigen sich Photofrin II bedingte intrazelluläre Veränderungen. Während in der *Abbildung 34* (Zellen ohne Photofrin II) als dunkle Zellbezirke nur die Nucleoli imponieren, erscheinen in *Abbildung 35* neben den Nucleoli weitere intrazelluläre häufig kernnahe gelegene dunkle Zellbereiche, die auf Photofrin II zurückzuführen sind. Betrachtet man die dazugehörige Fluoreszenzaufnahme (*Abb. 36*) und vergleicht sie mit *Abbildung 35*, so fluoreszieren fast nur diese kernnahe gelegenen dunklen Zellbezirke (Durchmesser ca 5 μm) und weisen auf die intensive Photofrin II - Speicherung dieser Zellbezirke hin. Hier wird etwa 40 % des intrazellulären Photofrin II gespeichert. Wegen eines zu kleinen Bestrahlungsfensters bei dieser Fluoreszenzaufnahme fluoreszieren die Zellen am Bildrand nicht. Ferner wurde beobachtet, daß die M 24 - Zellen auch nach längerer Bestrahlung kaum Zellwandveränderungen in Form von blasenförmigen Ausstülpungen entwickeln. Bei diesen Zellen überwiegen lichtbestrahlungsbedingte Kernveränderungen, die ihren Ausgang jedoch nicht vom besonders intensiv speichernden Zellbezirk nehmen.

.

8.5.3 ROS 17/2.8 - ZELLEN

Die Abbildungen 37 + 39 stellen alle dieselbe Zelle dar. Abbildung 37 zeigt die Zelle vor der Fluoreszenzaufnahme, nachdem die Zelle für 96 Stunden mit Photofrin II versetzt worden war. Zwischen Zellkern und Vakuolen erstreckt sich ein stärker pigmentierter Bereich. Betrachtet man dazu die Fluoreszenzaufnahme in Abbildung 38, so erscheint dieser stärker pigmentierte Bereich, der etwa ein Drittel der Fläche des Zytoplasmas ausmacht, rot fluoreszierend. Der bei weitem größte Anteil des Photofrin II wird bei dieser Tumorzelle ROS 17/2.8 also relativ großflächig und kernnahe gespeichert. Abbildung 39 zeigt die Situation nach einer ca. 3-minütigen Lichtbestrahlung: Erkennbar sind Unregelmäßigkeiten an der Zellwand; der Zellkern erscheint etwas schärfer vom Zytoplasma abgegrenzt als vor der Bestrahlung.

8.5.4 ROS 25/1 - ZELLEN

Die ROS 25/1 - Zellen zeigen unter längerer Ph II - Einwirkung (über 24 Stunden Einwirkzeit) zunehmend mehr Vakuolen (Abb. 40). In der Abbildung 43 sind Zellen ohne Photofrin II - Einwirkung zu sehen. Obwohl die Zellen der beiden Abbildungen 40 und 43 bis auf die Photofrin II - Einwirkung völlig gleich behandelt wurden, enthalten Zellen mit Photofrin II erheblich

mehr Vakuolen als gleichartige Zellen ohne Photofrin II, die nahezu keine Vakuolen zeigen. Kaum Vakuolen zeigen auch Zellen, die nach 24 - stündiger Inkubation mit Photofrin II für 72 Stunden in Photofrin II - freiem Medium wuchsen.

Betrachtet man die Abbildungen 40 + 42, die alle dieselben Zellen zeigen, werden schon direkt nach dreiminütiger Bestrahlung Zellwandveränderungen und eine schärfere Konturierung der Zellkerne sichtbar (Abb.42). Sucht man die in Abbildung 41 fluoreszierenden Bezirke, die wiederum kernnahe liegen, in der Abbildung 40 auf, so stellen sich die fluoreszierenden Bezirke wieder dunkel pigmentiert dar. Diese Bezirke intensivster Fluoreszenz beanspruchen flächenmäßig etwa ein Sechstel des Zytoplasmas. Dunkel pigmentierte Bezirke, die wahrscheinlich Photofrin II bevorzugt speichern würden, sind auch auf der Abbildung 43 - Zellen ohne Photofrin II - vorhanden. Das Photofrin II bewirkt demnach nicht die stärkere Pigmentierung, sondern wird vielmehr in den Bezirken dunkler Pigmentierung vermehrt angereichert.

Tabelle 22:Zusammenstellung der intrazellulären Beobachtungen

	OS 24	M 24	ROS 25/1	ROS 17/2.8
Ph II-Speicherung	diffus	konzentriert	(diffus)	diffus
Vakuolen nach 96 h Ph II-Einwirkzeit	+	+	++	+
blasenförmige Ausstülpungen nach Bestrahlung	+	-	+	+

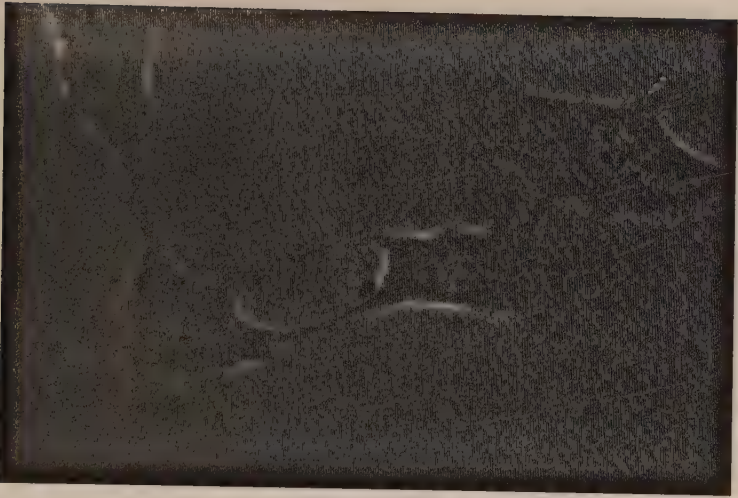


Abb. 31 : OS 24 - Zellen ohne Photofrin II

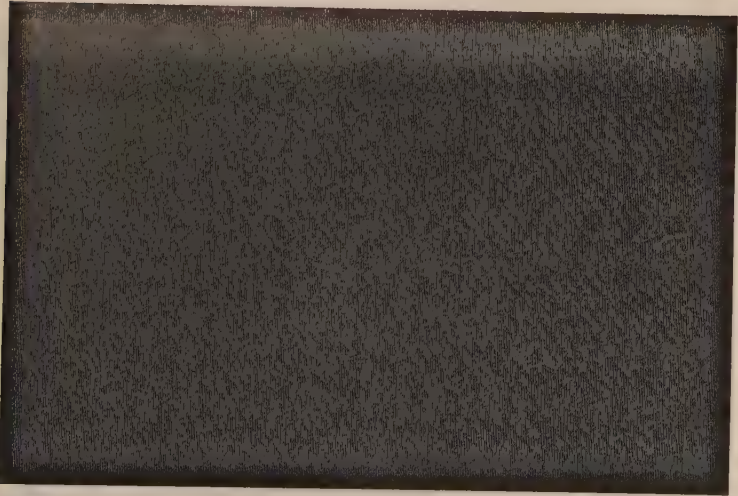


Abb. 32 : Fluoreszenzaufnahme einer OS 24 - Zelle, die 96 Stunden mit Photofrin II inkubiert wurde.

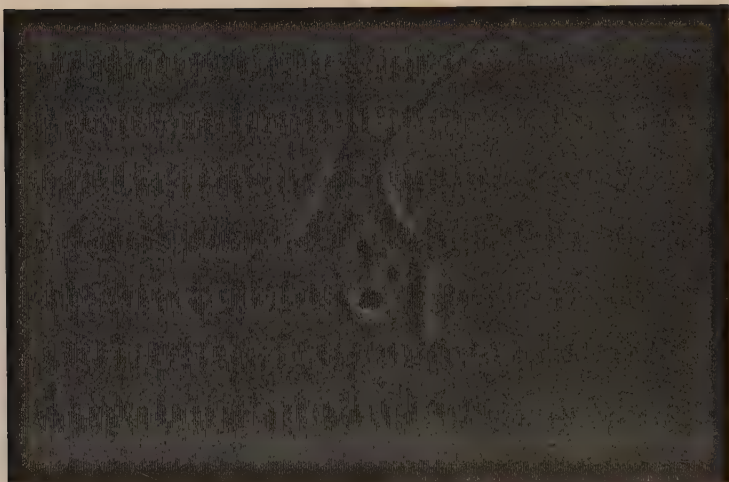


Abb. 33 : Dieselben OS 24 - Zelle aus Abb.32 direkt nach
ca. 3 - minütiger Bestrahlung

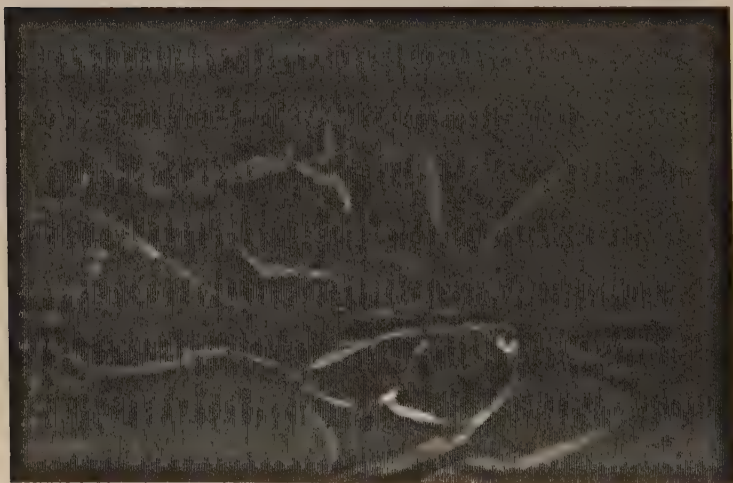


Abb. 34 : M 24 - Zellen ohne Photofrin II

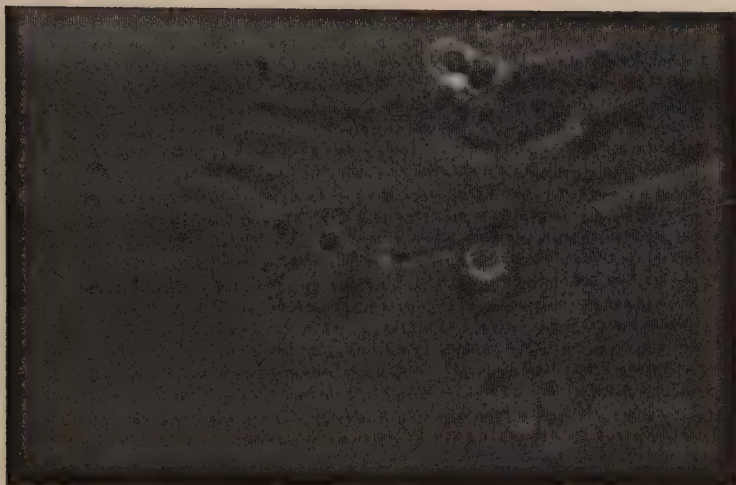


Abb. 35 : M 24 - Zellen nach 96 Stunden Photofrin II -
Einwirkzeit vor der Bestrahlung

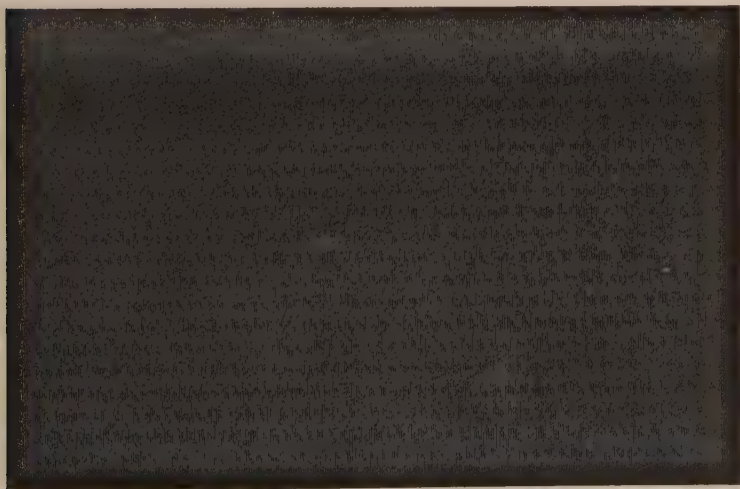


Abb. 36 : Fluoreszenzaufnahme derselben M 24 - Zellen
aus Abb.35

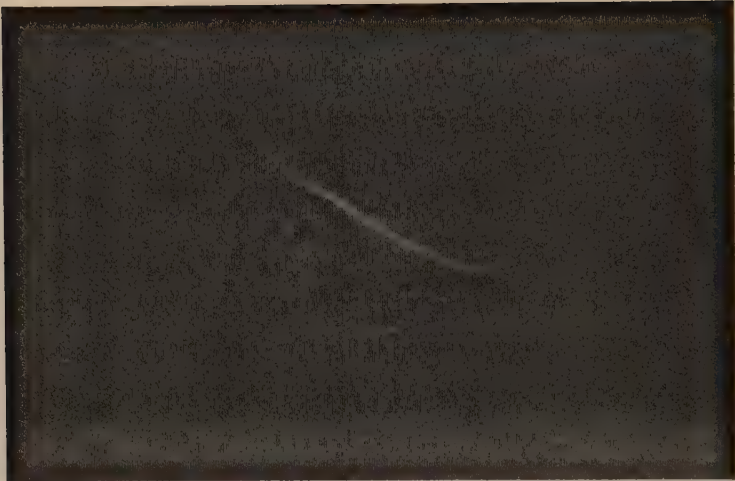


Abb. 37 : ROS 17/2.8 - Zelle nach 96-stündiger Photofrin II - Einwirkzeit vor der Bestrahlung

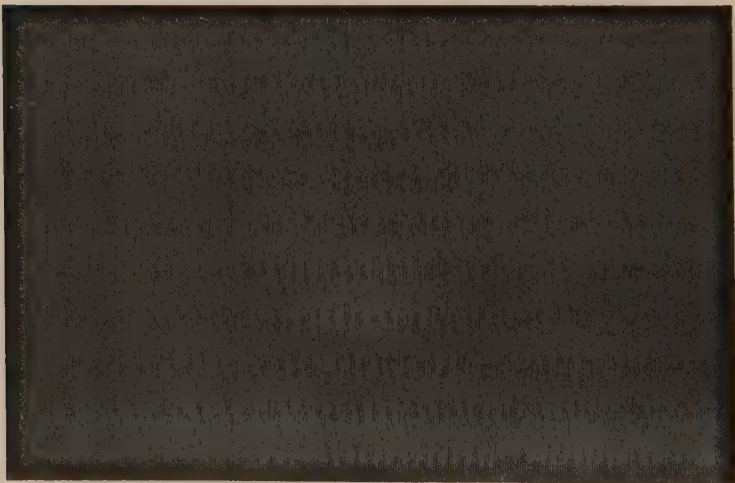


Abb. 38 : Fluoreszenzaufnahme derselben ROS 17/2.8 - Zelle aus Abb.37

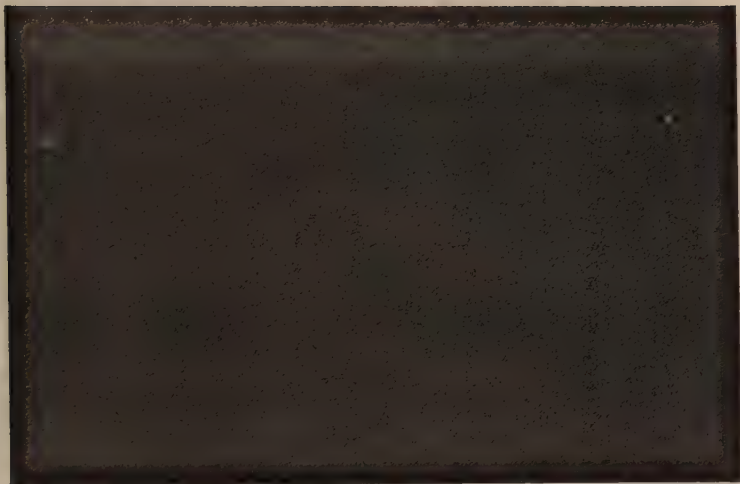


Abb. 39 : Dieselbe ROS 17/2.8 - Zelle aus Abb.37
direkt nach ca. 3 - minütiger Bestrahlung

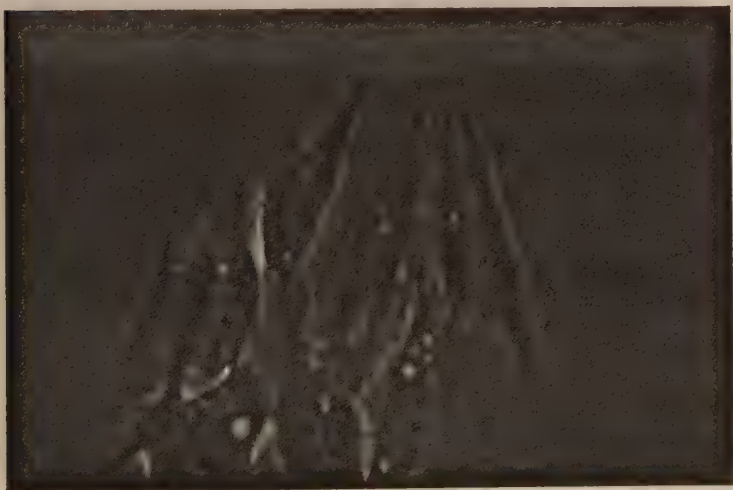


Abb. 40 : ROS 25/1 - Zellen nach 96-stündiger Photo-
frin II - Einwirkzeit vor der Bestrahlung

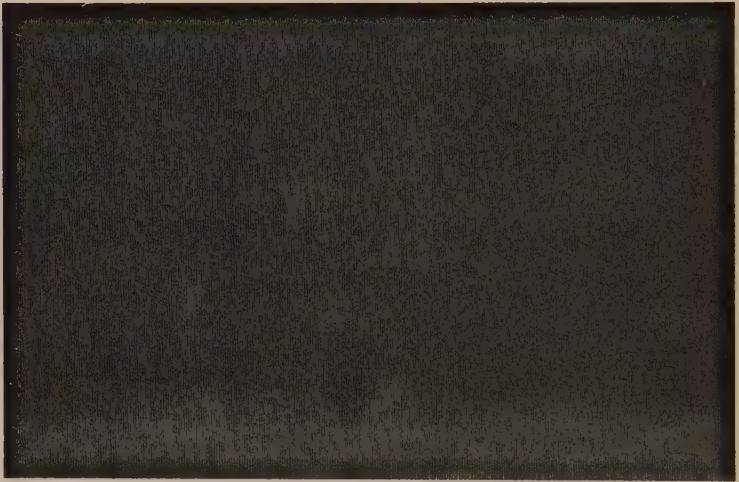


Abb. 41 : Fluoreszenzaufnahme derselben ROS 25/1 - Zellen
aus Abb.40

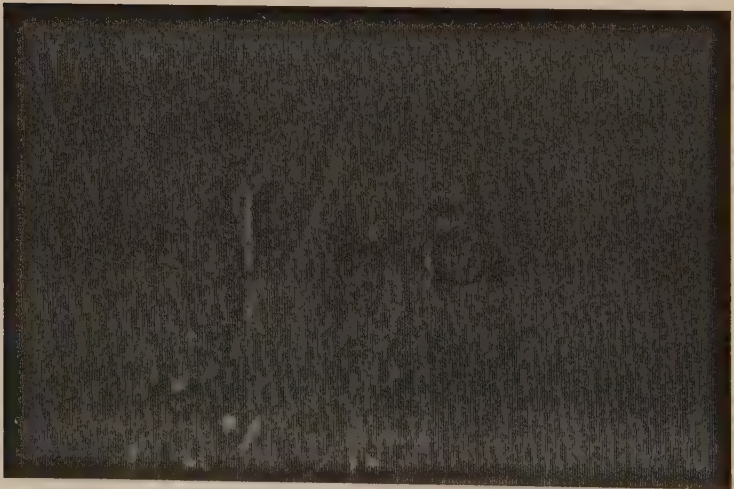


Abb. 42 : Dieselben ROS 25/1 - Zellen aus Abb.40
direkt nach ca. 3 - minütiger Bestrahlung

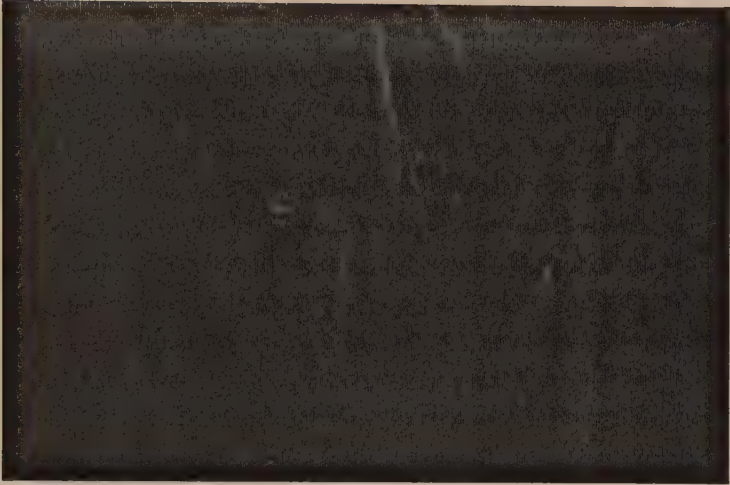


Abb. 43 : ROS 25/1 - Zellen ohne Photofrin II

9. DISKUSSION

9.1 DISKUSSION DER IN VITRO UNTERSUCHUNGEN

9.1.1 PHARMAKOKINETIK DES PHOTOFRIN II IN VITRO

In dieser Arbeit wird die Pharmakokinetik des Photofrin II in vitro an sieben verschiedenen Zelllinien untersucht. Bei allen sieben Zelllinien (Tumorzellen und Normalzellen) zeigt sich prinzipiell das gleiche Photofrin II - Aufnahme- und Abgabeverhalten. Alle untersuchten Zellen akkumulieren Photofrin II. Die Aufnahme von Photofrin II ist jeweils in der 1. Stunde am höchsten und nimmt offenbar von Stunde zu Stunde ab, so daß nach etwa 48 Stunden Photofrin II - Einwirkzeit ein Plateau des intrazellulären Photofrin II - Spiegels erreicht wird und nur noch geringe Änderungen stattfinden. Die Verläufe der Photofrin II - Aufnahmekurven vermitteln den Eindruck, daß sich zwischen der Aufnahme und Abgabe dieser Substanz nach 48 Stunden ein Gleichgewicht einstellt. Die Photofrin II - Abgabe erfolgt analog, d.h. besonders in der 1. Stunde findet eine sehr schnelle Photofrin II - Clearance statt, die zwischen der 1. und 3. Stunde fast zum Erliegen kommt, aber dann wieder zunimmt und schließlich (6. bis 96. Stunde) immer langsamer erfolgt. Nach 96-stündiger Clearance enthalten die Zellen immer noch 10 - 15 % der anfänglichen Photofrin II - Menge. Entsprechend den Kurvenverläufen der Clearance - Messungen ist damit zu rechnen, daß bis zum

vollständigen Ausscheiden des Photofrin II Wochen vergehen (siehe 7.2.2).

Im direkten Vergleich zwischen einer Tumorzelllinie und einer entsprechenden Normalzelllinie lassen sich jeweils quantitative Unterschiede in der Photofrin II - Aufnahme und -Abgabe finden. Tumorzellen zeigen eine langsamere Photofrin II - Clearance als die entsprechenden Normalzellen. Die Photofrin II - Aufnahme scheint bei Tumorzellen nur zum Teil erhöht zu sein und ist dann nicht höher als max. 100 % der Aufnahme der Normalzellen (wie beim Zellpaar ROS 17/2.8 - Osteosarkomzelle und ROS 25/1 -Fibroblast). Diese Aussage muß dahingehend eingeschränkt werden, daß die Normalität der Fibroblasten ROS 25/1 nicht sicher ist. Allgemein sollte berücksichtigt werden, daß in Zellkultur wachsende Zelllinien ihre ursprünglichen in vivo-Eigenschaften nie sicher besitzen. Zwischen den Zelllinien OS 24 - Tumorzelle und M 24 - Normalzelle hingegen besteht bezüglich des Photofrin II - Aufnahmeverhaltens kaum eine höhere Akkumulation im Tumor. Der Photofrin II - Gehalt liegt bei den untersuchten Tumorzellen nach 24 bis 96-stündiger Ausschleuszeit etwa $50 \div 80$ % höher als bei den entsprechenden Normalzellen. Beim Ausschleusverhalten besteht im Gegensatz zum Aufnahmeverhalten von Photofrin II eine größere Differenz zwischen Tumorzellen und Normalzellen beim Mäusezellpaar OS 24 / M 24. Die OS 24 - Tumorzellen akkumulieren Photofrin II länger in größeren Mengen als M 24 - Zellen. Während beim Rattenzellpaar ROS 17/2.8 und ROS 25/1 die Dif-

ferenz der gespeicherten Photofrin II - Mengen immer mehr abnimmt, und gegen Ende der Abgabemessung kaum noch ein Unterschied besteht. Diese erhöhten Speicherungen in der Tumorzelle fallen global betrachtet nicht so erheblich aus, als daß die bekannten großen Unterschiede der Photofrin II- Speicherung zwischen Tumoren und Normalgewebe in vivo (46, 54, 63, 95) allein durch diese zellulär bedingte Differenz erklärbar wären.

Bezüglich des Einflusses der Zellage zum Zellverband erscheint eine Wechselwirkung zur Pharmakokinetik des Photofrin II zu bestehen. Bei isoliert liegenden Zellen ist nach 24 Stunden eine erhöhte Photofrin II - Akkumulation gegenüber Zellen am Zellverband vorhanden, die sich jedoch während der Abgabephase des Pharmakons innerhalb von 24 Stunden an das Photofrin II - Speicherniveau der Zellen im Zellverband annähert. Der Photofrin II - Umsatz erscheint also bei den isoliert liegenden Zellen höher zu sein. Wechselwirkungen der Zellen im Zellverband untereinander könnten dieses Versuchsergebnis begründen.

Zusammenfassend läßt sich aus den in vitro Versuchen feststellen:

- die Pharmakokinetik des Photofrin II ist bei Tumorzellen und Normalzellen prinzipiell gleich.
- Tumorzellen neigen zu höherer Photofrin II - Aufnahme als entsprechende Normalzellen.

- Tumorzellen retinieren Photofrin II länger bzw. in höherer Konzentration als Normalzellen.
- die aus in vivo - Untersuchungen bekannte stark erhöhte Photofrin II - Aufnahme und Retention bei Tumoren läßt sich allein aufgrund zellulärer Phänomene nicht erklären.

9.1.2 DISKUSSION DER PHOTOGRAPHISCHEN ZELLDOKUMENTATION

Im vorangegangenen Kapitel werden Ergebnisse diskutiert, die eine unterschiedliche intrazelluläre Verarbeitung des Photofrin II wahrscheinlich machen. Betrachtet man die Photographien aller vier Zelllinien, so fällt die Muskelzelllinie M 24 durch den in der Zelle vorhandenen, sehr scharf begrenzten, kernnahen Bereich auf, der einen ähnlich starken Kontrast wie die Nucleoli zeigt. Dieser Bezirk, der nach 96 Stunden ca. 40% des gesamten intrazellulären Photofrin II besitzt, wird allein durch die Einwirkung des Photofrin II optisch erkennbar.

Die drei anderen Zelltypen zeigen dieses Speicherungsverhalten nicht. Bei den Fibroblasten 25/1 findet die Photofrin II-Speicherung in noch relativ eng begrenzten Zellabschnitten statt; die typische Zellveränderung, die bei den M 24 - Zellen zu beobachten ist, ist jedoch nicht erkennbar. Dennoch entwickeln sich auch bei den Fibroblasten 25/1 Zellveränderungen, die auf Photofrin II zurückzuführen sind. Es treten sehr viele Vakuolen auf, die mit längerer Photofrin II - Ein-

wirkzeit in Anzahl und Volumen zunehmen.

Die beiden Tumorzelllinien OS 24 und ROS 17/2.8, beides Osteosarkome, zeigen unter Photofrin II - Einwirkung ebenfalls vereinzelt Vakuolen. Im Durchlichtphasenkontrastverfahren betrachtet sind bei diesen Zellen ansonsten keine zellulären Veränderungen erkennbar. Beide Zelllinien speichern das Photofrin II relativ diffus über einen größeren Zellbereich. Der Kern bleibt bei allen vier Zellarten arm an Photofrin II.

Zusammenfassend läßt sich aus den Beobachtungen an den verschiedenen Zelllinien feststellen:

- Die Hauptmenge des Photofrin II wird kernnahe gespeichert.
- Der Zellkern enthält kaum Photofrin II.
- Normalzellen zeigen unter längerer Photofrin II - Einwirkung deutliche intrazelluläre Veränderungen (Vakuolenbildung, intensiv dunkler Bezirk).
- Tumorzellen zeigen bis auf geringe Vakuolenbildung keine durch Photofrin II bedingten Veränderungen.
- Normalzellen speichern Photofrin II größtenteils in einem eng begrenzten Bezirk.
- Tumorzellen speichern Photofrin II größtenteils in einem Bezirk, der im Verhältnis zur gesamten Zelle sehr viel größer ist, als der hauptsächlich speichernde Bezirk in den Normalzellen.

9.2 DISKUSSION MIT ANDEREN PUBLIKATIONEN

Tierversuche haben eine bevorzugte HpD - Aufnahme und verzögerte -Abgabe von Tumorgewebe gegenüber benachbartem Normalgewebe aufgezeigt. Folglich kann Tumorgewebe durch lichtbedingte Aktivierung des Farbstoffes HpD - und somit induzierte photochemische Reaktion - selektiv zerstört werden . Dieser photodynamische Effekt wird erfolgreich zur Behandlung von menschlichen Tumoren angewendet. Man nennt diese Behandlungsmethode photodynamische Therapie (PDT).

Die Grundlage des photodynamischen Effekts ist jedoch noch ungeklärt; insbesondere hinsichtlich der verlängerten Retention des HpD im Tumorgewebe im Vergleich zum benachbarten Normalgewebe. Bestehen Unterschiede der HpD - Speicherung intrazellulär? Im wesentlichen sind zwei Verfahren zur Lösung dieser Fragestellungen angewendet worden. Zum einen erfolgte der Nachweis von Porphyrinen, die mit radioaktiven Isotopen markiert worden waren, mittels Radioautographie von Gewebebezirken, zum anderen wurde die Lokalisation der Porphyrine unter Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Weitere Versuche an mehreren Zelllinien können mehr Sicherheit bei der Aufstellung von Hypothesen schaffen.

Berns und Mitarbeiter (14, 15) haben im Rahmen dieser Fragestellungen einige in vitro Versuche durchgeführt. Sie stellen fest, daß HpD innerhalb der ersten 10 Stunden sehr schnell

von Tumor- und Normalzellen aufgenommen wird und daß sich beim HpD - Gehalt der Zelle nach 24 Stunden ein bestimmtes, zellabhängiges Niveau einpendelt. Tumorzellen und Normalzellen scheinen HpD in ähnlichen Verhältnissen aufzunehmen. Die HpD - Gesamtaufnahme der Zellen variiert von Zelllinie zu Zelllinie. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob maligne Zellen mehr oder weniger HpD aufnehmen als gutartige Zellen. Die HpD - Clearance aus Tumorzellen scheint langsamer zu erfolgen als die der Normalzellen.

Verfolgt man den Verlauf der HpD - Clearance, so retinieren die Zellen wahrscheinlich noch eine beträchtliche Zeit nach der HpD - Exposition Reste dieser Substanz. Auch Chan und Hart (21) berichten von einer im Vergleich zur Fibroblastzelle verzögerten HpD - Abgabe bei der Fibrosarkomzelle. Daß neoplastische Zellen eine höhere Affinität zu Porphyrin haben als normale Zellen, wird von Coszani et al. (27) beschrieben. Vergleichende Untersuchungen an Fibroblastzellen und Epithelzellen mit entsprechenden viral transformierten Zellen zeigen, daß das Verhältnis der Sensibilität gegenüber Licht 4,5 zu 1 (transformierte Fibroblastzelle zu Fibroblastzelle) und bei den Epithelzellen entsprechend 1,25 zu 1 ist. Diese unterschiedliche Sensibilität läßt sich auf eine höhere HpD - Aufnahme der Tumorzellen zurückführen. Unterschiede in der Interaktion der Substanz mit zellulären Systemen und eine unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation des

HpD wären als Ursache denkbar (4). In dieser Arbeit wird eine Abhängigkeit der intrazellulären HpD - Konzentration von der metabolischen Aktivität der Zellen im Gegensatz zu einer Veröffentlichung von Ramponi (77) verneint. Alle diese Meßergebnisse sind mittels Fluoreszenzmikroskopie gewonnen worden.

Henderson und Mitarbeiter (44) haben entsprechende Versuche unter Anwendung einer radioaktiven Markierung des HpD mit dem Isotop ^3H durchgeführt. Die HpD - Aufnahme aller untersuchten Zelllinien zeigen eine HpD - Akkumulation, die in etwa den Photofrin II - Aufnahmekurven entspricht, die in der vorliegenden Arbeit gemessen wurden. Die HpD - Ausscheidungskurven verlaufen bei den auf Radioaktivität zurückzuführenden Messungen anders als die in dieser vorliegenden Arbeit erstellten Kurven. Nach 3 Stunden Ausschleuszeit sind etwa 33 % des anfänglichen HpD - Gehaltes (24 Stunden inkubiert) in die extrazelluläre Umgebung übergegangen. Nach 48 Stunden sind immer noch 50% der anfänglichen HpD - Menge in der Zelle vorhanden. Die Abnahme der Fluoreszenz HpD-haltiger Zellen (siehe Photofrin II - Abgabekurven in Abschnitt 7) ist mit ca.75% nach 48-stündiger Ausschleuszeit erheblich höher. Diese Differenz läßt sich durch die unterschiedliche Methode erklären. Der radioaktive ^3H des HpD ist intrazellulär einem Protonenaustausch unterworfen, so daß die gemessene Radioaktivität nicht mehr nur auf den HpD - Gehalt zurückzuführen ist.

In der vorliegenden Arbeit sind Versuche zur Bestimmung des Einflusses der Zelldichte auf die intrazelluläre HpD - Fluoreszenz erfolgt. Wie sich zeigt, wirkt sich die Zelldichte auf die Pharmakokinetik des Photofrin II aus. Isoliert liegende Zellen speichern etwas mehr Photofrin II als im Zellverband liegende Zellen; sie geben es jedoch auch schneller wieder ab. Nach Moan et al. (72) bleibt die Sensibilität der Zelle gegenüber Licht von der Zelldichte unbeeinflusst. Eine Ausnahme bildet die isolierte Zelle, die relativ am unempfindlichsten gegenüber Licht ist.

Trotz der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Mehrspeicherung des HpD in isolierten Zellen, liegt hier kein Widerspruch vor; vielmehr werden auch bezüglich des zellschädigenden Mechanismus während der PDT interzelluläre für den photodynamischen Effekt nachteilige Wechselwirkungen bei enger Zelllage vermutet (72).

Im wesentlichen wurden in den hier erwähnten Publikationen keine Widersprüche zu den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen eruiert. In einer weiteren Arbeit von Moan et al. (73) wird beschrieben, daß Tumorzellen etwas mehr HpD zurückhalten als Normalzellen. Dieser Unterschied in der bevorzugten Retention von HpD in Tumoren, der ebenfalls in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird, kann nicht allein die hohen Konzentrationsunterschiede in vivo (Faktor 4 bis 10) erklären (8, 38, 54, 75, 81).

Bugelski und Mitarbeiter (20) deuteten schon 1981 an, daß gewebebedingte Faktoren wie die vaskuläre Permeabilität, Mangel an einer adäquaten Lymphdrainage, unspezifischen Bindungen von Serumproteinen an Stroma und das retikuloendotheliale System bei der tumorselektiven HpD - Mehrspeicherung ebenso wesentlich sein können wie pH-Unterschiede im Tumor- und im Normalgewebe. Eine Beobachtung von Henderson und Mitarbeitern (45) bei in vivo Versuchen weist ein Ausbleiben der Destruktion HpD - haltiger Tumore nach, wenn die Tumore direkt nach der photodynamischen Behandlung explantiert werden. Die Tumorzellen würden im Gegensatz zu vielen in vitro Beobachtungen (4, 72, 73, 95) nicht direkt durch die photodynamische Therapie vernichtet.

Eine primäre Zerstörung der Mikrozirkulation der Tumore, die ihren Ausgang in einer photodynamischen Affektion des vaskulären Endothels nimmt, wird u.a. von Star et al. (93) propagiert. Die Fluorescein - Angiographie läßt bereits 20 min. nach PDT keine Perfusion der Blutgefäße auf der Tumoroberfläche erkennen. Histologische Untersuchungen 24 Stunden nach photodynamischer Therapie zeigen, daß die meisten Blutgefäße im nekrotischen Tumor erheblich verletzt sind (37).

Eine Störung der Mikrozirkulation der Tumore kann aber nicht die einzige Ursache für die Zerstörung von Tumorzellen sein ; denn auch Carcinomata in situ lassen sich erfolgreich mittels

PDT behandeln. Und das Carcinoma in situ hat, soweit bekannt, keine spezielle Blutversorgung (55). Ferner wird eine Abhängigkeit des Ortes der primären Schädigung durch die PDT von der Oxygenierung (60,102), der Temperatur (18) und vom pH - Wert (18, 98) des Gewebes vermutet. Gute Oxygenierung und niedriger pH - Wert begünstigen demnach die Zellschädigung bzw. die HpD - Aufnahme.

Jori (58) stellt eine Beziehung zwischen der bevorzugten Hämatoporphyrin - Aufnahme von Tumoren und der LDL - Aufnahme mittels rezeptorbedingter Endozytose fest. Hämatoporphyrin wird zu einem erheblichen Anteil in der LDL - Fraktion transportiert. Zellen mit einer hohen Mitoserate benötigen große Mengen an Cholesterin und anderen Lipiden für die Membransynthese, so daß Tumorzellen deshalb gewöhnlich eine größere Menge LDL assimilieren als umliegende Normalzellen. Über diesen Hp - Transport - Mechanismus mittels LDL wird Hp auch in anderen Zellen, die eine hohe Zellteilungsrate besitzen, aufgenommen. So akkumulieren traumatisiertes Gewebe und auch z.B. stimulierte Lymphozyten vermehrt Hp (28). An Liposomen gebundenes HpD wird von neoplastischen Zellen schneller aufgenommen und langsamer abgegeben als einfach in Wasser gelöstes HpD (27).

Als Auswertung dieser Untersuchungen lassen sich einige Kernaussagen bilden:

Tumorgewebe speichert auf zellulärer Ebene bereits vermehrt

bzw. länger HpD als das umgebende Normalgewebe. Mögliche Ursachen der Photofrin II - Mehrspeicherung sind der Grad der Oxygenierung, der pH - Wert der Zellen und eine Abhängigkeit von der Mitoserate über den Hämatoporphyrin - Transport der LDL - Lipidfraktion. Photofrin II - haltige Tumorzellen und Normalzellen können isoliert zerstört werden. Während der PDT erfolgt die Tumorerstörung jedoch offenbar primär nach Störung der Mikrozirkulation auf Grund PDT bedingter Alterationen der Tumorgefäßwände.

Läßt sich nun aber intrazellulär ein Unterschied in der Photofrin II - Speicherung feststellen? Von Pamponi et al. (77) wird berichtet, daß nach einer 30-minütigen Inkubationszeit mit HpD diese Substanz hauptsächlich in der Zellmembran und im peripheren Zytoplasma vorhanden ist. Nach 48-stündiger Inkubationszeit ist eine andere intrazelluläre HpD - Verteilung gegeben. Die Zellmembran und der periphere Zytoplasmateil enthalten nur noch relativ geringe Mengen des HpD . Schneckenburger und Mitarbeiter (88) zeigen weiter, daß die rote HpD - Fluoreszenz nun hauptsächlich im zentralen Zytoplasmateil gemessen werden kann. Andere Arbeiten bestätigen zum Teil diese Ergebnisse (8). So nennen Berns et al. (15, 16) ebenfalls die perinukleäre Zellregion als Ort der höchsten Fluoreszenzintensität. Jedoch finden sie keine bzw. nur geringe Rotfluoreszenz im Zellkern. Die Beschreibung von Berns et al. entsprechen den photographisch dokumentierten

Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit.

Der geringe intranukleäre HpD - Gehalt läßt sich vielleicht durch Überlagerung des Zellkernes mit dem besonders HpD-haltigen perinukleären Zytoplasma beim Mikroskopieren erklären. Aus den Untersuchungen von Schneckenburger und Mitarbeitern (88) geht auch eindeutig hervor, daß die Zellgebiete mit hoher Photofrin II - Fluoreszenz besonders reich an Mitochondrien sind. Die hohe perinukleäre HpD - Konzentration ist auf den hier hohen Bestand an Mitochondrien und vielleicht auch auf den hier ebenfalls hohen Bestand an Lysosomen zurückzuführen (15, 16, 26). Die intrazelluläre Hämatoporphyrin-Konzentration kann bis zum 20-fachen der externen Konzentration ansteigen (24). Bei den vorliegenden Untersuchungen wird gerade bei den an Mitochondrien reichen Muskelzellen M 24 eine ganz ungewöhnliche intensive Photofrin II - Konzentration in einem kleinen, scharf abgegrenzten Zellbereich beobachtet. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein Photofrin II - Depot, das durch eine Membran abgekapselt ist. Denn zellfremde Substanzen wie auch das Photofrin II werden anfangs meist im Zytoplasma der Zelle deponiert und nach längerer intrazellulärer Verweildauer häufig von einer Membran umgeben.

Bei den drei anderen photographierten Zelllinien ist der Übergang des stark fluoreszierenden Zellbereiches zu den gering fluoreszierenden Bereichen eher fließend und würde damit mehr

einer intrazellulär gleichmäßigeren Verteilung von Mitochondrien entsprechen. Eine Erklärung dieser Beobachtungen ließe sich durch einen spezifischen Mitochondrien - Farbnachweis ermöglichen.

Auch bei den Fibroblasten ROS 25/1 lassen sich nach längerer Photofrin II - Einwirkzeit unter mikroskopischer Beobachtung intrazelluläre Veränderungen in Form von Vakuolenbildung und stärkerer Pigmentierung des stark Photofrin II - haltigen Zellbereichs erkennen. Die Vakuolenbildung könnte auf eine intrazelluläre osmotische Störung und Veränderung der Wasserverteilung hindeuten. Erweiterungen von endoplasmatischen Zysternen des Endoplasmatischen Retikulums können zu dieser Vakuolenbildung führen. Das Photofrin II scheint also bei den ROS 25/1 - Zellen in den Wasserhaushalt einzugreifen, da gleich alte und identisch behandelte Zellen ohne Photofrin II keine Vakuolen aufweisen. Auch ist die Vakuolenbildung nach Photofrin II - Abgabe dieser Zellen reversibel. Demgegenüber zeigen Tumorzellen nur vereinzelt Photofrin II - bedingte Veränderungen. Der fluoreszierende Bereich ist in Tumorzellen im Verhältnis zur gesamten Zelle größer als bei Normalzellen.

Dies könnte auf die in der Tumorzelle erhöhte metabolische Aktivität mit vermehrter Mitochondrienzahl zurückzuführen sein. Die Zerstörung der Zellen erfolgt analog zu den vorrangig vorhandenen HpD Speicherungsarten in den Zellen. Anfangs - nach einer kurzen Inkubationszeit - werden die Zellen bei

Bestrahlung vorwiegend durch Zellmembranverletzungen zerstört (70 , 71). Später - nach längerer HpD - Einwirkzeit - wird die mitochondriale Zerstörung als hauptsächliche Ursache der Zellyse angesehen (23). Tatsuta et al. (95) führen elektronenmikroskopische Beobachtungen an mit HpD und Lichtbestrahlung behandelten Zellen durch. Die Zelltoxizität basiert nach diesen Untersuchungen auf der Zerstörung von Mitochondrien, einer Dilatation des rauhen Endoplasmatischen Retikulums und auf Veränderungen der Kernmembran. Die degenerativen Veränderungen sind häufiger und größer beim gering differenzierten Adenokarzinom als bei höher differenzierten Zellen.

Betrachtet man unter diesem Aspekt die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien, ROS 25/1 Fibroblasten und M 24 Muskelzelle (weniger differenziert) einerseits und andererseits ROS 17/2.8 oder OS 24 (höher differenzierte Osteosarkomzellen), so nimmt die intrazelluläre Konzentrierung des Photofrin II auf einen kleinen Zellbereich mit abnehmender Zelldifferenzierung zu.

Ordnet man die photographisch untersuchten Zelllinien nach ihrer Dignität, M 24 (so weit bekannt eine benigne Muskelzelllinie), ROS 25/1 (nicht osteogene Fibroblasten unklarer Dignität) und ROS 17/2.8 oder OS 24 (maligne Osteosarkomzellen), so zeigt sich eine Abnahme der intrazellulären Photofrin II - Konzentrierung auf einem kleinen Zellbezirk mit abnehmender Dignität der Zellen. Die nach allen bisherigen

Erkenntnissen benigne M 24 Zelle speichert Photofrin II größtenteils in einem begrenzten Bereich, während die nicht sicher benignen ROS 25/1 Fibroblasten bereits etwas diffuser speichern. Die Osteosarkomzellen OS 24 und ROS 17/2.8 speichern Photofrin II noch diffuser.

10. ZUSAMMENFASSUNG

Mittels in vitro - Versuchen werden Unterschiede in der Pharmakokinetik und in der intrazellulären Photofrin II (DHE) - Verteilung zwischen Tumorzellen und vergleichbaren Normalzellen von Ratte und Maus aufgezeigt. Die Photofrin II- Aufnahme ist demnach bei den Tumorzellen tendenziell höher als bei den Normalzellen. Bei der Photofrin II - Abgabe speichern die Tumorzellen im Zeitraum von ca. 24 Stunden bis mindestens 96 Stunden (Versuchsende) 50 bis 80 % mehr an Substanz als die Normalzellen. Dieser relativ geringe Unterschied zwischen Tumor- und Normalzellen in vitro kann Differenzen der $4 \div 10$ fachen Photofrin II - Konzentration in vivo zugunsten der Tumore gegenüber gesundem Nachbargewebe nicht allein erklären.

Es scheinen demnach extrazelluläre Parameter, wie Mikrozirkulationsstörungen, Mangel einer adäquaten Lymphdrainage, niedriger pH - Wert, u.a. im Tumor einen ganz erheblichen Anteil bei der Photofrin II - Mehrspeicherung zu haben. Die phasenkontrastmikroskopische Beobachtung von Photofrin II-bedingten intrazellulären Veränderungen hauptsächlich in den Normalzellen im direkten Vergleich mit Fluoreszenzaufnahmen der gleichen Zellen läßt eine Abhängigkeit der intrazellulären Photofrin II - Verteilung vom Grad der Dignität der Zellen vermuten. Zellen höherer Dignität, wie z.B. Muskelzellen, scheinen demnach Photofrin II auf einen kleinen perinukleären Zellbezirk hochkonzentriert zu speichern, während maligne Zellen diese Substanz diffuser einlagern.

11. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Ackermann, R., J. Pitts, I. Rosenthal :
Reactions of Singlet Oxygen with Olefins, Sulfides
and Compounds of Biological Significance . In
Symposium on Oxidation by Singlet Oxygen , Division
of Petroleum Chemistry , American Chemical Society ,
Preprints of Papers , Vol 16 pp. A25 - A34 (1971)
- (2) Aida, M., T. Hirashima :
Cancer of the Esophagus
In Hayata, Y., T.J. Dougherty (eds) :
Lasers and Hematoporphyrin Derivative in Cancer ,
p 39 Tokyo , Igaku - Shoin (1983)
- (3) Aida, M., M. Kawaguchi :
Gastric Cancer
In Hayata, Y., T.J. Dougherty (eds) :
Lasers and Hematoporphyrin Derivative in Cancer ,
p 39 Tokyo , Igaku - Shoin (1983)
- (4) Ambesi - Impiombato, F.S., A. Andreoni, R. Cubeddu,
M. Esposito, M. Mastrocinque, D. Tramontano :
Effects of HpD and Laser on Transformed and Corres -
ponding Normal Cultured Cells : Differential Cytoto -
xicity as an in Vitro Model for Tumor Photochemo -
therapy
In Porphyrins in Tumor Phototherapy
Edited by Andreoni, A., and R. Cubeddu
Plenum Press , New York (1984)
- (5) Andreoni, A., R. Cubeddu, S. De Silvestri, P. Laporta
F.S. Ambesi-Impiombato, M. Esposito, M. Mastrocinque
D. Tramontano :
Effects of Laser Irradiation on Hematoporphyrin -
Treated Normal and Transformed Thyroid Cells in
Culture
Cancer Res. 43 , 2076 - 2080 (1983)
- (6) Andreoni, A., R. Cubeddu, :
Fluorescence Properties of HpD and its Components
Porphyrins in Tumor Phototherapy ,
Edited by Andreoni and Cubeddu
Plenum Press , New York (1984)

- (7) Auler, H., G. Banzer :
Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei
geschwulstkranken Menschen und Tieren
Z. Krebsforschung 53 , 65 - 68 (1942)

- (8) Baumgartner, R., J. Feyh, A. Götz, D. Jocham,
H. Schneckenburger, H. Stepp, E. Unsöld :
Experimental Study on Laser - Induced Fluorescence
of Hematoporphyrin Derivative (HpD) in Tumor Cells
and Animal Tissue
Laser 2 : 4 - 9 (1986)

- (9) Beier, Dähnert, Rödenbeck :
Medizinische Physik
VEB Gustav Fischer Verlag , Jena

- (10) Bellnier, D.A., T.J. Dougherty :
Membrane Lysis in Chinese Hamster Ovary Cells Trea -
ted with Hematoporphyrin Derivative plus Light
Photochem. Photobiol. 36 , 43 - 47 (1982)

- (11) Benson, R.C.Jr., G.M. Farrow, J.H. Kinsey,
D.A. Cortese, H. Zincke, D.C. Utz, :
Detection and Localization of in Situ Carcinoma of
the Bladder with Hematoporphyrin Derivative
Mayo Clinic.Proc. 57 , 548 (1982)

- (12) Benson, R.C.Jr., J.H. Kinsey, D.A. Cortese,
G.M. Farrow, D.C. Utz :
Treatment of Transitional Cell Carcinoma of the
Bladder with Hematoporphyrin Derivative Phototherapy
J. Urol. 130 , 1090 (1983)

- (13) Berns, M.W., A. Dahlman, F. Johnson, R. Burns,
D. Sperling, M. Gultinan, A. Siemens, R. Walter,
W. Wright, M. Hammer-Wilson, A. Wile :
In Vitro Cellular Effects of Hematoporphyrin
Derivative
Cancer Res. 42 , 2325 - 2329 (1982)

- (14) Berns, M.W., M. Wilson, P. Rentzepis, R. Burns,
A. Wile :
Cell Biology of Hematoporphyrin Derivative (HpD)
Lasers Med. Surg. 2 , 261 - 266 (1983)

- (15) Berns, M.W., A. Wile, A. Dahlman, F. Johnson, R. Burns, D. Sperling, M. Gultinan, A. Siemens, R. Walter, M. Hammer - Wilson :
Cellular Uptake , Excretion and Localization of Hematoporphyrin Derivative (HpD)
In Porphyrin Photosensitization
Edited by Kessel, D., and T.J. Dougherty
Plenum Press New York (1983)
- (16) Berns, M.W., M. Hammer - Wilson, R.J. Walter, W. Wright, M.-H. Chow, M. Nahabadian, A. Wile :
Uptakes and Localization of HpD and " Active Fraction " in Tissue Culture and in Serially Biopsied Human Tumors
In : Porphyrin Localization and Treatment of Tumors
Edited by Doiron, D.R., and C.J. Gomer ,
Alan R. Liss Inc., New York (1984)
- (17) Bickers, D.R., R. Dixit, R. Mukhar :
Hematoporphyrin Photosensitization of Epidermal Microsomes Results in Destruction of Cytochrome P - 450 and Decreased Monooxygenase Activities and Heme Content
Biochem. Biophys. Res. Commun. 108 , 1032-1039 (1982)
- (18) Böhmer, R.M., G. Morstyn :
Uptake of Hematoporphyrin Derivative by Normal and Malignant Cells: Effect of Serum, pH, Temperature and Cell Size
Cancer Research 45 , 5328-5334 (1985)
- (19) Bonnett, R., R. Ridge, P.A. Scouridos :
On the Nature of Haematoporphyrin Derivative
J. Chem. Soc. Perkin 3135 - 3140 (1981)
- (20) Bugelski, P.J., C.W. Porter, T.J. Dougherty :
Autoradiographic Distribution of Hematoporphyrin Derivative in Normal and Tumor Tissue of the Mouse
Cancer Res. 41 , 4606 - 4612 (1981)

- (21) Chan, W.S., I.R. Hart :
Cellular Studies on the Uptake and Retention of Haematoporphyrin Derivative and Aluminium Sulphonated Phthalocyanine
In Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases
Edited by Jori, G., C. Perria
Edizioni Libreria Progetto Via Marzolo, 28 PD (1985)
- (22) Chang, C., T.J. Dougherty :
Photoradiation Therapy : Kinetics and Thermodynamics of Porphyrin Uptake and Loss in Normal and Malignant Cells in Culture
Radiat Res. 74 , 498 (1978)
- (23) Chen Ting, I., Guo Zhong - he :
Photodynamic Effect of the He - Ne Laser with HpD on the Ultrastructure of Rhabdomyosarcoma Cell
In : Porphyrins in Tumor Phototherapy
Edited by Andreoni, A., and R. Cubeddu
Plenum Press , New York (1984)
- (24) Christensen, T., J. Moan :
Binding of Hematoporphyrin to Synchronized Cells from the Line NHIK 3025
Cancer Letters 9 , 105 - 110 (1980)
- (25) Christensen, T., T. Sandquist, K. Feren, H. Waksvik, J. Moan :
Retention and Photodynamic Effects of Hematoporphyrin Derivative in Cells after Prolonged Cultivation in the Presence of Porphyrin
Brit. J. Cancer 48 , 35 - 43 (1983)
- (26) Cozzani, I., G. Jori, E. Reddi, R. Fortunato, B. Granati, M. Felice, L. Tomio, P. Zarati :
Distribution of Endogenous and Injected Porphyrins at the Subcellular Level in Rat Hepatocytes and in Ascites Hepatoma
Chem. Biol. Interact , 37 , 67 - 75 (1981)

- (27) Cozzani, I., G. Jori, E. Reddi, L. Tomio, P.L. Zorat
T. Sicuro, G. Malvaldi :
Interaction of Free and Liposome - Bound Porphyrins
with Normal and Malignant Cells : Biochemical and
Photosensitization Studies in Vitro and in Vivo
In : Porphyrins in Tumor Phototherapy
Edited by Andreoni, A., and R. Cubeddu
Plenum Press , New York (1984)
- (28) Docchio, F., R. Ramponi, C.A. Sacchi, G. Bottioli,
I. Freitas :
Time - Resolved Fluorescence Spectroscopy of Hema-
toporphyrin - Derivative in Human Lymphocytes
Chem. - Biol. Interactions , 50 , 135 - 141 (1984)
- (29) Doiron, D.R., C.J. Gomer, eds :
Porphyrin Localization and Treatment of Tumors
Alan R. Liss Inc., New York (1984)
- (30) Dougherty, T.J., G.B. Grindey, R. Fiel, K.R. Weis-
haupt, D.G. Boyle :
Photoradiation Therapy II . Cure of Animal Tumors
with Hematoporphyrin and Light
J. Nat. Canc. Inst. 55 , 115 - 121 (1975)
- (31) Dougherty, T.J. :
Photoradiation Therapy for Cutaneous and Subcu -
taneous Malignancies
J. Invest. Dermatol. 77 , 122 - 124 (1981)
- (32) Dougherty, T.J. :
An Overview of the States of Photoradiation Therapy
In: Porphyrin Localization and Treatment of Tumors
Edited by Doiron, D.R., and C.J. Gomer
Alan R. Liss Inc., New York (1984)
- (33) Dougherty, T.J., W.R. Potter, K. Weishaupt :
The Structure of the Active Component of
Hematoporphyrin Derivative
In: Porphyrin Localization and Treatment of Tumors
Edited by Doiron, D.R., and C.J. Gomer
Alan R. Liss Inc., New York (1984)

- (34) Dougherty, T.J. :
Photodynamic Therapy
In Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases
Edited by Jori, G., C. Perria
Edizioni Libreria Progetto Via Marsolo, 28 PD (1985)
- (35) Dougherty, T.J., K.R. Weishaupt, D.G. Boyle :
Photodynamic Therapy and Cancer
In: Principles & Practice of Oncology (2nd ed)
Edited by De Vita, Hellman, Rosenberg
Lippincott Co Philadelphia (1985)
- (36) Felix, C.C., K. Reszka, R.C. Sealy :
Free Radicals from Photoreduction of Hematoporphyrin in Aqueous Solution
Photochem. Photobiol. 37 , 141 (1983)
- (37) Franken, K.A.P., J.L. van Delft, T. Dubbelman,
D. de Wolff-Rouendaal, J.A. Oosterhuis, W.M. Star,
H.P.A. Marijnissen :
Hematoporphyrin Derivative Photoradiation Treatment
of Experimental Malignant Melanoma in the Anterior
Chamber of the Rabbit
Current Eye Research 4, 5 , 641 - 654 (1985)
- (38) Goetz, A., J. Feyh, H. Schneckenburger, P. Conzen,
D. Jocham, E. Unsöld :
Quantitative in Vivo Measurements of Photofrin II in
Tumor and Adjacent Tumor - Free Tissues
In Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases
Edited by Jori, G., C. Perria
Edizioni Libreria Progetto Via Marzolo, 28 PD (1985)
- (39) Gomer, C.J., T.J. Dougherty :
Determination of ^3H - and ^{14}C Hematoporphyrin
Derivative Distribution in Malignant and Normal
Tissue
Cancer Res. 39 , 146 - 151 (1979)

- (40) Gregorie, H.B., E.Q. Horger, J.L. Ward, J.F. Green,
 T. Richards, H.C. Robertson, T.B. Stevenson :
 Hematoporphyrin - Derivative Fluorescence in Malig -
 nant Neoplasma
 Ann. Surg. 167 , 820 - 828 (1968)

- (41) Grossweiner, L., J.B. Grossweiner :
 Hydrodynamic Effects in the Photosensitized Lysis
 of Liposomes
 Photochem. Photobiol. 35 , 583 - 586 (1982)

- (42) Harzmann, R., D. Gericke, G.H. Bichler, D. Erdmann :
 Transurethral transplantiertes Modell eines Karzinoms
 im Bereich der Harnblase des Kaninchens
 Urologe (A) 17 , 125 - 129 (1978)

- (43) Hayata, Y., H. Kato, C.Konaka, R. Amemiya, J. Ono,
 I. Ogawa, K. Kinoshita, H. Sakai, H. Takahashi :
 Photoradiation Therapy with Hematoporphyrin
 Derivative in Early and Stage 1 Lung Cancer
 Chest 86 , 169 - 177 (1984)

- (44) Henderson, B.W., D.A. Bellnier, B. Ziring,
 T.J. Dougherty :
 Aspects of the Cellular Uptake and Retention of
 Hematoporphyrin Derivative and their Correlation
 with the Biological Response to PRT in Vitro
 In : Porphyrin Photosensitization ,
 eds D. Kessel & T.J. Dougherty
 Plenum Press (New York) p 129 (1983)

- (45) Henderson, B., T.J. Dougherty :
 Studies on the Mechanism of Tumor Destruction by
 Photoradiation Therapy
 In Porphyrin Localization and Treatment of Tumors
 Edited by Doiron, D.R., and C.J. Gomer
 Alan R. Liss New York (1984)

- (46) Jocham, D., G. Staehler, Ch. Chaussy, C. Hammer,
 U. Löhrs :
 Laserbehandlung von Blasentumoren nach Photosensi-
 bilisierung mit Hematoporphyrin - Derivat
 Urologe A 20 , 340 - 343 (1981)

- (47) Jocham, D. :
Medizinische Laseranwendungen : Ein Statusbericht
nach den Kongressen in Santa Barbara , Mailand und
München
Laser und Optoelektronik 3 , 255 (1983)
- (48) Jocham, D., G. Staehler, Ch. Chaussy, E. Schmiedt,
E. Unsöld, C. Hammer, U. Löhrs, W. Gorisch :
Integrated Day Laser Therapy of Bladder Tumors after
Photosensitization with Hematoporphyrin Derivative :
The Use of a Light Dispersion Medium
AUS program , ISSN 0190-2393, p 155, No. 225
American Urological Assoc. (Abstr.) (1983)
- (49) Jocham, D., G. Staehler, E. Unsöld, Ch. Chaussy,
W. Gorisch :
Frühdiagnose des Blasen-Karzinoms durch laserindu-
zierte Fluoreszenz - Experimentelle Untersuchungen
Verhandlungsbericht d. Dtsch. Ges. f. Urologie
Berlin-Heidelberg-New York , Springer: 351 (1983)
- (50) Jocham, D. :
Integrale Laser - Photoradiotherapie des Blasenkar-
zinoms nach tumorselektiver Photosensibilisierung
mit Hämatoporphyrin - Derivat
Habilitationsschrift an der LMU München
119 - 120 (1984)
- (51) Jocham, D., G. Staehler, Ch. Chaussy, U. Löhrs,
E. Unsöld :
C.E. Alken Preis 1983: Integrale Photoradiothera-
pie des Blasenkarzinoms nach tumorselektiver Photo-
sensibilisierung mit Hämatoporphyrin-Derivat (HpD).
Akt. Urol. 15 , 109 -115 (1984)
- (52) Jocham, D., G. Staehler, R. Baumgartner, E. Unsöld :
Die integrale photodynamische Therapie beim multi -
fokalen Blasenkarzinom - Erste klinische Erfahrungen
Urologe (A) 24 , 316 - 319 (1985)

- (53) Jocham, D., G. Staehler, Ch. Chaussy, U. Löhrs, E. Unsöld :
Experimentelle und erste klinische Erfahrungen mit der integralen Photoradiotherapie des multifokalen Blasenkarzinoms und des Carcinoma in situ nach tumorselektiver Photosensibilisierung mit Hämatoporphyrin - Derivat (HpD)
Helvetica chirurgica acta 52 , 469 - 472 (1985)
- (54) Jocham, D., G. Staehler, Ch. Chaussy, D. Dietrich, W. Weinsheimer, C. Hammer, U. Specht, U. Löhrs, E. Unsöld :
Pharmakokinetik des Hämatoporphyrinderivats (HpD) und experimentelle Grundlagen einer integralen Photoradiotherapie des Blasenkarzinoms
In : Experimentelle Urologie (Hrsg.: R. Harzmann et al.)
Berlin - Heidelberg : Springer , 453 - 459 (1985)
- (55) Jocham, D., E. Unsöld :
Photodynamic Therapy of Bladder Tumors
In : Photodynamic Therapy of Tumors and other Diseases , edited by Jori, G., C. Perria
Edizioni Libreria Progetto Via Marsolo, 28 PD (1985)
- (56) Jocham, D., G. Staehler, E. Unsöld, E. Schmiedt :
Aktuelle Informationen zu photodynamischen Verfahren beim Blasenkarzinom - ihrer experimentellen Basis und der klinischen Erfahrung
Helvetica chirurgica acta 53 , 337 - 343 (1986)
- (57) Jocham, D., E. Schmiedt, R. Baumgartner, E. Unsöld :
Integral Laser-Photodynamic Treatment of Multifocal Bladder Carcinoma Photosensitized by Hematoporphyrin Derivative
Eur. Urol. 12 : suppl. 1 pp 43 - 46 (1986)
- (58) Jori, G. :
Pharmacokinetic Studies with Hematoporphyrin in Tumor - Bearing Mice
In Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases
Edited by Jori, G., C. Perria
Edizioni Libreria Progetto Via Marzolo, 28 PD (1985)

- (59) Kessel, D., C.K. Chang, B. Musselman :
Chemical, Biologic, and Biophysical Studies on
Hematoporphyrin Derivative
In: Methods in Porphyrin Photosensitization
Edited by Kessel, D.
Plenum Press New York (1985)
- (60) Lee See, K., I.J. Forbes, W.H. Betts :
Oxygen Dependency of Photocytotoxicity with Hemato-
porphyrin Derivative
Photochemistry and Photobiology Vol. 39 Nr. 5
pp 631- 634 (1984)
- (61) " Leitz info "
Fa. Leitz , Wetzlar 4 (1983)
- (62) Lipson, R.L., E.J. Baldes, A.M. Ohlsen :
The Use of a Derivative of Hematoporphyrin in
Tumor Detection
J. Nat. Canc. Inst. 26 (1), 1 - 11 (1961)
- (63) Lipson, R.L., E.J. Baldes, M.J. Gray :
Hematoporphyrin Derivative for Detection and
Management of Cancer
Cancer 20 , 2255 - 2257 (1967)
- (64) Malik, Z., M. Djaldetti :
Destruction of Erythroleukemia , Myelocytic
Leukemia and Burkitt Lymphoma Cells by Photo -
activated Protoporphyrin
Int. J. Cancer 26 , 495 - 500 (1980)
- (65) Moan, J., T. Christensen :
Photodynamic Inactivation of Cancer Cells in Vitro ,
Effect of Irradiation Temperature and Dose Fractio -
nation
Canc. Lett. 6 , 331 - 335 (1979)
- (66) Moan, J., T. Christensen :
Photodynamic Effects of Human Cells Exposed to
Light in the Presence of Hematoporphyrin. Localiza-
tion of the Active Dye
Canc. Lett. 11 , 209 - 214 (1981)

- (67) Moan, J., H.B. Steen, K. Feren, T. Christensen :
Uptake of Hematoporphyrin Derivative and Sensitized
Photoinactivation of C 3H Cells with Different
Oncogenic Potential
Cancer Letters 14 , 291 (1981)
- (68) Moan, J., T. Christensen, G. Volden, T. Sandquist :
Release of Lysosomal Enzymes and Lactate Dehydroge -
nase Due to Hematoporphyrin Derivative and Light
Irradiation of NHIK 3025 Cells in Vitro
Ann. Cancer Res. 14 , 46 - 52 (1982)
- (69) Moan, J., J.V. Johanssen, T. Christensen, T. Espevik
J.B. Mc Ghie :
Porphyrin - Sensitized Photoinactivation of Human
Cells in Vitro
Am. J. Path. 109 , 184 - 192 (1982)
- (70) Moan, J., J. Mc Ghie, P.B. Jacobsen :
Photodynamic Effects on Cells in Vitro Exposed to
Hematoporphyrin Derivate and Light
Photochem. Photobiol. 37 , 599 - 604 (1983)
- (71) Moan, J. :
Fluorescence of Porphyrins in Cells
In : Porphyrins in Tumor Phototherapy
Edited by Andreoni, A., and R. Cubeddu
Plenum Press , New York (1984)
- (72) Moan, J., T. Christensen, P.B. Jacobsen :
Photodynamic Effects on Cells in Vitro Labelled
with Hematoporphyrin Derivative
Photobiochemistry and Photobiophysics 7
349 - 358 (1984)
- (73) Moan, J., T. Christensen, P.B. Jacobsen :
Porphyrin - Sensitized Photoinactivation of Cells in
Vitro
In Porphyrin Localization and Treatment of Tumors
Edited by Doiron, D.R., and C.J. Gomer ,
Alan R. Liss Inc., New York (1984)

- (74) Moan, J., S. Sommer :
Action Spectra for Hematoporphyrin Derivative and
Photofrin II with Respect to Sensitization of Human
Cells in Vitro to Photoinactivation
Photochemistry and Photobiology Vol.40 No.5 (1984)
pp 631 - 634 (1984)
- (75) Moan, J. :
Porphyrin Photosensitization of Cells
In Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases
Edited by Jori, G., C. Perria
Edizioni Libreria Progetto Via Marzolo, 28 PD (1985)
- (76) Ohi, T., A. Tsuchiya :
Superficial Bladder Tumors
In Hayata, Y., T.J. Dougherty (eds) :
Lasers and Hematoporphyrin Derivative in Cancer ,
p 39 Tokyo , Igaku - Shoin (1983)
- (77) Pamponi, R., G. Bottirololi, C.A. Sacchi, R. Supino :
Fluorimetric Analysis of Hematoporphyrin -
Derivative Behaviour at Cellular Level
In Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases
Edited by Jori, G., C. Perria
Edizioni Libreria Progetto Via Marzolo, 28 PD (1985)
- (78) Paul, J. :
Cell and Tissue Culture
Churchill Livingstone Edinburgh p.99 ff (1975)
- (79) Policard, A. :
Etudes sur les aspects offerts par des tumeur experi-
mentales examinee a la lumiere de woods
Compt. Rend. Soc. Biol. 91 , 1423 - 1424 (1924)
- (80) Potter, W.R., T.S. Mang :
Photofrin II Levels by in Vivo Fluorescence Photo -
metry
In Porphyrin Localization and Treatment of Tumors
Alan R. Liss Inc. , New York , 177 - 186 (1984)

- (81) Profio, A.E. :
Laser Excited Fluorescence of Hematoporphyrin Deri -
vative for Diagnosis of Cancer
IEEE Journal of Quantum Electronics
Vol. QE 20 , Nr. 12 (1984)
- (82) Raab, O. :
Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf
Infusorien
Arch. klin. Med. 56 , 524 - 546 (1895)
- (83) Rothauge, C.F., P. Röttger, J. Kraushaar, J. Kracht
H.D. Nöske :
Die Fototherapie des Blasenkarzinoms im Lichte der
Histologie
Diagnostik & Intensivtherapie 8 , 17 - 18 (1983)
- (84) Sachs, L. :
Angewandte Statistik
Springer Verlag , 5. Auflage (1978)
- (85) Salet, C., G. Moreno :
Photodynamic Effects of Haematoporphyrin on Respi -
ration and Calcium Uptake in Isolated Mitochondria
Int. J. Rad. Biol. 39 , 227 - 230 (1981)
- (86) Schmidt, J., M. Casser - Bette, G.A. Rodan,
C. Baumgartner - Decker, V. Erfle :
Bone Tumor - Inducing Retroviruses and Osteoblastic
Cells in Vitro : Target Cell Specificity and Effects
of Viral Infection
In Current Advances in Skeletogenesis III
Edited by Hurwitz, S., J. Sela
Heilliger Publisher , Jerusalem (1986)
- (87) Schneckenburger, H., E. Unsöld, W. Weinsheimer,
D. Jocham :
Time - Resolved Laser Fluorescence and Photo -
bleaching of Single Cells after Photosensitization
with Hematoporphyrin Derivative (HpD)
In : Porphyrins in Tumor Phototherapy
Eds.: A. Andreoni, R. Cubeddu
New York - London : Plenum Press, 137 - 141 (1984)

- (88) Schneckenburger, H., F. Pauker, E. Unsöld, D. Jocham :
Intracellular Distribution and Retention of the
Fluorescent Components of Photofrin II Measured by
Time - Resolved Microfluorometry
In Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases
Edited by Jori, G., C. Perria
Edizioni Libreria Progetto Via Marzolo, 28 PD (1985)
- (89) Shapiro, D.L., L.L. Nardone, S.A. Rooney,
E.K. Motoyama, J.L. Munoz :
Phospholipid Biosynthesis and Secretion by a Cell
Line (A 549) which Resembles Type II Alveolar
Epithelial Cells
Biochimica et Biophysica Acta 530, 197 - 207 (1978)
- (90) Soma, H., S. Nutahara :
Cancer of the Female Genitale
In Hayata, Y., T.J. Dougherty (eds) :
Lasers and Hematoporphyrin Derivative in Cancer ,
p 39 Tokyo , Igaku - Shoin (1983)
- (91) Spikes, J. :
Photobiology of Porphyrins
In Porphyrin Localization and Treatment of Tumors
Alan R. Liss Inc., New York (1984)
- (92) Staehler, G., D. Jocham, E. Schmiedt, Ch. Chaussy,
E. Unsöld :
Grundlagen einer Diagnose und Therapie von Blasen -
tumoren nach Photosensibilisierung mit Hämatoporphyrin -
Derivat (HpD)
Verhandlungsbericht d. Dtsch. Ges. f. Lasermedizin
Eds. G. Staehler, A. Hofstetter
München-Bern-Wien: W. Zuckschwerdt, 146-152 (1983)
- (93) Star, W.M., J.P.A. Marijnissen, A.E. van den Berg -
Blok, A.C.C. Versteeg, H.S. Reinhold :
In Vivo Observation of the Effects of HpD - Photo -
sensitization on the Microcirculation of Rat Mammary
Tumor and Normal Tissues Growing in Transparent
Chambers
In Photodynamic therapy of tumors and other diseases
Edited by Jori, G., C. Perria
Edizioni Libreria Progetto Via Marzolo, 28 PD (1985)

- (94) Tappeiner, H., A. Jesionek :
Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen
München Med. Wochenschr. 1 , 2042 - 2044 (1903)
- (95) Tatsuta, M., R. Yamamoto, H. Yamamura, H. Iishi,
S. Noguchi, M. Ichii, S. Okuda :
Photodynamic Effects of Exposure to Hematoporphyrin
Derivatives and Dye - Laser Radiation on Human
Gastric Adenocarcinoma Cells
J.N.C.I. 73 , 59 - 67 (1984)
- (96) Tomio, L., Pl. Zorat, G. Jori, E. Reddi, B. Salvato,
L. Corti, F. Calzavara :
Elimination Pathway of Hematoporphyrin from Normal
and Tumor Bearing Rats
Tumori 68(4) , 283 - 286 (1982)
- (97) Unsöld, E., R. Baumgartner, D. Jocham, H. Schnecken-
burger :
Physikalisch - technische Aspekte der Diagnose und
Therapie photosensibilisierter Tumoren
In: Verhandlungsbericht der Deutschen Gesellschaft
für Lasermedizin
(Eds.: E. Keiditsch, P.W. Ascher, F. Frank)
München - Zürich : Erdmann - Brenger GmbH Verlag
215 - 219 (1985)
- (98) Vever - Bizet, C., D. Braudt, T. Le Doan :
Ph - Dependent Incorporation of Dicarboxylic Por-
phyrins into Membrane Models
In Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases
Edited by Jori, G., C. Perria
Edizioni Libreria Progetto Via Marzolo, 28 PD (1985)
- (99) Wagner, F.:
Biomathematik
Mediscript-Verlag, München (1983)
- (100) Weishaupt, K.R., C.J. Gomer and T.J. Dougherty :
Identification of Singlet Oxygen as the Cytotoxic
Agent in Photo - Inactivation of a Murine Tumor
Cancer Res. 36 , 2326 - 2329 (1976)

- (101) Winkelman, J., G. Slater, J. Grossman :
The Concentration in Tumor and other Tissues of
Parenterally Administered Tritium - and ^{14}C -
Labeled Tetraphenylporphyrinsulfonate
Canc. Res. 27 (1) , 2060 - 2064 (1967)
- (102) Zhou, C., W. Yang, Z. Ding, Y. Wang, X. Fan,
X. Zhu, H. Sheng, Y. Chen, X. Ha :
The Biological Effects of HpD - PDT Treatment on
the Brain in Normal Mice : A Light and Electron
Microscopic Study
In Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases
Edited by Jori, G., C. Perria
Edizioni Libreria Progetto Via Marzolo, 28 PD (1985)

DANKSAGUNG

Dieser Beitrag zur Pharmakokinetik des Photofrin II im Tumor und Normalgewebe auf zellulärer Ebene entstand in den Jahren 1985 bis 1987 während meiner Tätigkeit als Doktorand an der urologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München in Zusammenarbeit mit dem Zentralen Laserlabor der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH in Neuherberg bei München.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. D. Jocham, der diese Arbeit stets gefördert und ihr immer großes Interesse entgegengebracht hat. Seine großzügige Unterstützung, seine Impulse und fachlichen Ratschläge haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Professor Dr.med. E.Schmiedt, Direktor der Urologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern, sowie Herrn Professor Dr.med. H.Rabes, Leiter der Abteilung für Experimentelle Medizin am Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, Kliniken Innenstadt, danke ich für ihre engagierte Übernahme der Korrekturen.

Für stete fachliche Beratung bezüglich physikalischer Belange bei der Auswahl und Anwendung der Meßapparatur gebührt Herrn Professor Dr.rer.nat. H.Schneckenburger mein Dank.

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde im Institut für Angewandte Optik der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH durchgeführt und mit vielen Anregungen und Ratschlägen gefördert, wofür ich insbesondere dem Leiter des Zentralen Laserlabors, Herrn Dr. E. Unsöld, sowie Herrn Dr. R. Baumgarten dankbar bin.

Den Herren Dr. J. Schmidt und Professor Dr. A. Luz aus der Pathologie und Dr. F. J. Wiebel aus der Toxikologie der GSF in Neuherberg habe ich für ihre fachkundige Beratung hinsichtlich der Zellauswahl, Zellkulturhaltung sowie der Bereitstellung der Zellen besonders zu danken.

Schließlich sage ich auch allen anderen Mitarbeitern der GSF in Neuherberg meinen Dank, die meine Arbeit unterstützt haben, wobei sich insbesondere Frau H. Fißlinger mit tatkräftiger Hilfe bei der Zellkulturhaltung verdient gemacht hat.

LEBENS LAUF

Geburtstag, -ort:	22. April 1960 in Hannover	
Eltern:	Günter Wistokat, Professor Ingrid Wistokat, Sportlehrerin	
Schulbesuch:	1967 - 1971 1971 - 1980	Grundschule in Hannover Gymnasium Humboldtschule in Hannover (Abitur)
Wehrdienst:	1980 - 1981	als Wehrpflichtiger
Studium:	12.05.1981 08.04.1983 21.04.86-22.03.87 06.05.1987	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universi- tät München Physikum Famulaturen am Kreiskrankenhaus Gehrden und in der Universitätsklinik "Royal Infirmary" in Glasgow Praktisches Jahr bei Prof.Dr.med. Heberer in der Chirurg. Klinik Großhadern Prof.Dr.med. Wirth und Prof.Dr.med. Refior in der Orthopäd. Klinik Großhadern Prof.Dr.med. Wirtzfeld in der 1. Medizin. Klinik Ingolstadt Medizinisches Staatsexamen
Nebentätigkeit:	01.08.83-31.07.86	Stelle als Tutor des Hoch- schulkuratoriums in München
Approbation:	27.05.1987	
Berufstätigkeit:	06.07.87-12.10.87 01.12.87- z.Zt.	Behringwerke AG Assistenzarzt in der Chirurgie am Stadtkrankenhaus Wittingen

